

**CHARAKTERISIERUNG DER BIOKOMPATIBILITÄT UND  
BIOFUNKTIONALITÄT VON AMINOCELLULOSEN IN  
ZELLKULTURMODELLEN UND EVALUIERUNG DER  
ANTIMIKROBIELLEN WIRKSAMKEIT**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät**

**der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl. Biol. Susanne Stitterich, geb. Finger

geboren am 27.11.1985 in Pößneck

GUTACHTER:

1. PD Dr. rer. nat. et med. habil. Uta-Christina Hipler, Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Heinze, Jena
3. Prof. Dr. med. habil. Pietro Nenoff, Rötha

TAG DER ÖFFENTLICHEN VERTEIDIGUNG: 04.02.2020

# INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Zusammenfassung .....	VII
1. Einleitung .....	1
1.1 Aminocellulose – eine funktionalisierte Cellulose .....	1
1.2 <i>Candida albicans</i> – ein Modellorganismus zur Prüfung der Biofunktionalität.....	4
1.3 Humane Zellkulturmodelle zur Prüfung der Biokompatibilität.....	7
1.4 Biokompatibilität und Biofunktionalität.....	10
1.5 Zielstellung .....	12
2. Material und Methoden .....	13
2.1 Materialien.....	13
2.2 Aminocellulose.....	20
2.2.1 Herstellung .....	20
2.2.2 Nachweis auf Endotoxine.....	20
2.2.3 Mutagenitätsuntersuchung .....	21
2.2.4 Inhibition von ROS und RNS.....	22
2.3 Kultivierung humaner Zellen und Mikroorganismen .....	22
2.3.1 HaCaT-Keratinocyten .....	22
2.3.2 Normale humane epidermale Keratinocyten.....	23
2.3.3 Normale humane dermale Fibroblasten .....	23
2.3.4 <i>Candida albicans</i> .....	23
2.3.5 Zweidimensionale Co-Kulturmodelle .....	24
2.3.6 Dreidimensionale Co-Kulturmodelle .....	24
2.4 Biochemische Methoden zur Bestimmung der Biokompatibilität von AC .....	27
2.4.1 Bestimmung des ATP-Gehalts .....	27
2.4.2 Bestimmung des Gesamt-Proteingehalts.....	27
2.4.3 Bestimmung der Zytotoxizität.....	27

2.4.4	Quantitative Bestimmung von Interleukinen .....	28
2.5	Methoden zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung von AC .....	29
2.5.1	Wachstumsuntersuchung von <i>C. albicans</i> .....	29
2.5.2	Bestimmung des mikrobiellen ATP-Gehalts.....	29
2.6	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.6.1	Isolation von gDNA und Quantifizierung von <i>C. albicans</i> in 2d-Co-Kulturmodellen ..	30
2.6.2	Isolation von RNA aus 3d-Hautmodellen und Untersuchung der relativen Expression von Entzündungsmarkern und antimikrobiellen Peptiden .....	31
2.7	Histologische Präparation von 3d-Co-Kulturmodellen .....	33
2.8	Mikroskopische Analysen .....	34
2.8.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	34
2.8.2	Durchlichtmikroskopie.....	34
2.8.3	Rasterelektronenmikroskopie.....	34
2.8.4	Transmissionselektronenmikroskopie.....	35
2.9	Statistische Analyse.....	35
3.	Ergebnisse .....	36
3.1	Untersuchung der AC auf Endotoxine.....	36
3.2	Untersuchung der AC auf Mutagenität.....	37
3.3	Antioxidative Wirkung der AC gegenüber ROS und RNS .....	41
3.4	Antimikrobielle Wirkung der AC auf <i>C. albicans</i> .....	42
3.4.1	Einfluss auf das mikrobielle Wachstum.....	42
3.4.2	Mikroskopische Analyse von <i>C. albicans</i> nach Inkubation mit AC .....	45
3.5	Zellverträglichkeit der AC im 2d-HaCaT-Kulturmodell.....	47
3.5.1	Viabilität, Zytotoxizität und Freisetzung von Interleukinen im 2d-HaCaT-Kulturmodell .....	48
3.5.2	Vergleich der LC <sub>50</sub> -Werte nach 24- und 48-stündiger Inkubation der HaCaT-Keratinozyten mit AC .....	52
3.5.3	Mikroskopische Analyse von HaCaT-Keratinozyten nach Inkubation mit AC .....	53
3.6	Zellverträglichkeit der AC im 2d-Co-Kulturmodell.....	57
3.6.1	Viabilität, Zytotoxizität und Freisetzung von Interleukinen im 2d-Co-Kulturmodell ...	57

3.6.2 Quantifizierung von <i>C. albicans</i> im 2d-Co-Kulturmodell .....	66
3.7 Biokompatibilitätsindex der AC.....	70
3.8 Verträglichkeit der AC in 3d-Hautmodellen .....	70
3.8.1 Viabilität, Zytotoxizität und Freisetzung von Interleukinen in 3d-Hautmodellen .....	71
3.8.2 Expressionsanalyse von Antimikrobiellen Peptiden und Entzündungs-mediators in 3d-Hautmodellen .....	75
3.8.3 Histologische Untersuchung der 3d-Hautmodelle nach Inkubation mit AC.....	77
4. Diskussion.....	82
4.1 Untersuchungen der AC auf Endotoxine, Mutagenität und antioxidative Wirkung.....	83
4.2 Biofunktionalität von AC .....	84
4.3 Biokompatibilität von AC .....	88
4.4 Biokompatibilitätsindex von AC .....	90
4.5 Wirkung von AC in Co-Kulturmodellen.....	91
5. Ausblick .....	99
Literaturverzeichnis.....	i
Formelverzeichnis .....	xi
Abbildungsverzeichnis .....	xii
Tabellenverzeichnis.....	xvii
Ehrenwörtliche Erklärung .....	xviii
Danksagung.....	xix
Publikationsliste .....	xx

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	6-Deoxy-6-aminoalkyl Cellulose (Aminocellulose)
AGU	<i>Anhydro Glucopyranose Unit</i> (Anhydroglukoseeinheit)
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (erworbenes Abwehrschwachesyndrom)
AMP	antimikrobielles Peptid
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i> (Bicinchoninsäure)
BI	Biokompatibilitätsindex
BSA	bovines Serumalbumin
CA	<i>Candida albicans</i> ATCC MYA-2876
CD	<i>Candida albicans</i> DSM 1386
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CHX	Chlorhexidindigluconat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DP	<i>Degree of Polymerization</i> (Polymerisationsgrad)
DS	<i>Degree of Substitution</i> (Substitutionsgrad)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDA	Ethylendiamin
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetate</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EthD-2	Ethidiumhomodimer-2
EU	Endotoxineinheiten

FGM	<i>Fibroblast Growth Medium</i>
FKS	fetales Kälberserum
gDNA	<i>genomic Deoxyribonucleic Acid</i> (genomische Desoxyribonukleinsäure)
HaCaT	<i>Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes</i> (humane Zelllinie)
hBD	humanes Beta-Defensin
HE	Hämatoxylin-Eosin
hFGF	<i>human Fibroblastic Growth Factor</i> (Wachstumsfaktor)
IC <sub>50</sub>	<i>half-maximal Inhibitory Concentration</i> (halbmaximale inhibitorische Konzentration)
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
KBE	koloniebildende Einheit
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LC <sub>50</sub>	<i>half-maximal Lethal Concentration</i> (halbmaximale letale Konzentration)
LDH	Lactatdehydrogenase
LL-37	Cathelicidin
LPS	Lipopolysaccharid
MLN	Mikrotiterplatten-Laser-Nephelometrie
MTP	Mikrotiterplatte
NHDF	normale humane dermale Fibroblasten
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten
NK	Negativ-Kontrolle
OD	optische Dichte
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff Reaction</i> (Periodsäure-Schiff-Reaktion)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)

PK	Positiv-Kontrolle
PPC	positive Produktprobe
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (quantitative Polymerase-Kettenreaktion)
RLU	<i>Relative Light Units</i> (Relative Lichteinheiten)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (reaktive Stickstoffspezies)
RNU	<i>Relative Nephelometric Units</i> (Relative Nephelometrie-Einheiten)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit)
SDA	Sabouraud-Dextrose-Agar
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
TAEA	Triamotriethylamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$



## ZUSAMMENFASSUNG

Die zunehmende Entwicklung von Resistenzen und die Fähigkeit von Mikroorganismen Biofilme auszubilden, stellen u. a. in der Wundversorgung und in der Implantationsmedizin hohe Gesundheitsrisiken für Patienten dar. Es besteht ein großer Bedarf zur Entwicklung effizienter antimikrobiell wirksamer Substanzen, mit welchen solche Risiken eingedämmt werden können. Auf der Suche nach neuen biokompatiblen, medizinischen Produkten rücken AC als modifizierte Cellulosemoleküle in den Fokus der Forschung. Durch nukleophile Substitution werden in das natürlich vorkommende Cellulosemolekül funktionelle Aminogruppen eingefügt. Aufgrund der chemischen Modifizierung mit kationischen Aminogruppen liegt eine antimikrobielle Wirkung nahe. Somit eröffnen sich mit AC Anwendungsmöglichkeiten im medizinischen Bereich, beispielsweise als antimikrobiell wirksame Wundauflagen und Salben oder als antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen für Implantate. Um jedoch potentielle Anwendungsbereiche am Menschen zu erschließen, ist es erforderlich die Biokompatibilität und die Biofunktionalität von AC zu charakterisieren.

In dieser Arbeit wurden vier AC mit EDA oder TAEA als funktioneller Gruppe und unterschiedlichen DS von 0,35 bis 0,56 auf ihre Biokompatibilität und Biofunktionalität untersucht.

Die Biofunktionalität wurde als die antimikrobielle Wirkung der AC betrachtet. Die Biofunktionalität der AC wurde gegenüber dem opportunistischen humanpathogenen Hefepilz *C. albicans* mit zwei, auf unterschiedlichen Techniken beruhenden, Nachweismethoden untersucht. Die antimikrobielle Wirkung wurde gegenüber zwei *Candida*-Stämmen überprüft. Der *C. albicans*-Stamm ATCC MYA-2876 zeichnet sich durch ein invasives Wachstumsverhalten aus, während der *C. albicans*-Stamm DSM 1386 kein invasives Wachstum in Co-Kulturen mit humanen Zellen aufweist.

Es konnte gezeigt werden, dass alle getesteten AC antifungizid wirksam sind, wobei die antimikrobielle Wirkung abhängig von der Funktionalisierung der jeweiligen AC ist. AC mit TAEA als funktioneller Gruppe zeigten eine bessere antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber *C. albicans*, als AC mit EDA-Funktionalisierung. Hierbei konnten keine Unterschiede in der antimikrobiellen Wirkung im Zusammenhang des nicht-invasiven bzw. des invasiven Wachstumsverhaltens beider *Candida*-Stämme festgestellt werden.

Die Charakterisierung der Biokompatibilität von AC erfolgte *in-vitro* anhand von 2d-HaCaT-Keratinocytenmodellen mittels biochemischer, immunbiologischer und mikroskopischer Nachweismethoden. Hierbei zeigte sich eine höhere Zellverträglichkeit von AC mit EDA-Funktionalisierung und niedrigem DS in Abhängigkeit von der AC-Konzentration und der Inkubationszeit.

Zum Vergleich der Biofunktionalität und der Biokompatibilität wurde ein BI definiert. Wobei sich eine Substanz mit einem BI > 1 als biokompatibel erweist. Diese Eigenschaft konnte für AC mit EDA-

Funktionalisierung bestätigt werden. Dabei zeigten AC mit niedrigerem DS eine höhere Biokompatibilität, als AC mit höherem DS.

Die Wirkung der AC wurde des Weiteren in 2d-Co-Kulturmodellen aus HaCaT-Keratinocyten und den beiden *Candida*-Stämmen, als auch in 3d-Hautmodellen, welche ebenfalls mit den zwei *Candida*-Stämmen infiziert wurden, mittels biochemischen, molekularbiologischen, immunbiologischen und mikroskopischen Methoden untersucht. Auch in diesen komplexen Modellsystemen konnte eine bessere Zellverträglichkeit von AC mit EDA-Funktionalisierung, als auch eine bessere antimikrobielle Wirkung von AC mit TAEA als funktioneller Gruppe, bestätigt werden.

Mit dieser Arbeit wurde erstmals eine umfassende biologische Charakterisierung von AC mit unterschiedlichen Funktionalisierungen erstellt. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen bilden eine Grundlage für weitere Analysen hinsichtlich potentieller medizinischer Anwendungen. Hierfür erweisen sich AC mit EDA-Funktionalisierung und niedrigem DS ( $\leq 0,55$ ) als geeignete Kandidaten.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Aminocellulose – eine funktionalisierte Cellulose

Mit zunehmendem Interesse an umweltfreundlichen und biokompatiblen Produkten rücken natürlich vorkommende Polymere, wie beispielsweise Cellulose, immer mehr in den Fokus der Forschung<sup>46,65</sup>. Als häufigste vorkommende organische Verbindung stellt Cellulose eine nahezu unerschöpfliche Rohstoffquelle dar. Höhere Pflanzen sind die Hauptproduzenten von Cellulose. Als Bestandteil der pflanzlichen Zellwandstruktur dient Cellulose als zugfestes Grundgerüst. Neben Pflanzen sind auch einige Algen, wie *Valonia ventricosa* und *Chaetomorpha melagonicum*, als auch Bakterien, wie *Gluconacetobacter xylinum* und *Acanthamoeba castellan*, in der Lage Cellulose zu produzieren<sup>2,109</sup>.

Die Arbeiten des französischen Chemikers Payen haben den Begriff Cellulose geprägt. Im frühen 19. Jahrhundert untersuchte Payen die chemische Zusammensetzung von Holz und entdeckte dabei, dass nach Behandlung mit Salpetersäure und Natronlauge resistente, faserige Feststoffe von Holz übrig bleiben, welche als „les cellules“ bezeichnet wurden<sup>124</sup>. Mit seinen Untersuchungen hat Payen die Industrie der Cellulosederivate und die Entwicklung der Papierindustrie stark beeinflusst. Cellulose wird noch heute überwiegend zur Herstellung von Papier, Textilien und Baustoffen verwendet. Derivate des natürlichen Biopolymers finden Anwendung als Beschichtungen, Nahrungsmittel, Kosmetika und pharmazeutische Produkte<sup>20,57</sup>.

Chemisch gesehen ist Cellulose ein lineares, unverzweigtes Homopolysaccharid, welches aus  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpften Anhydro-Glukoseeinheiten (AGU) zusammengesetzt ist (Abbildung 1-1).

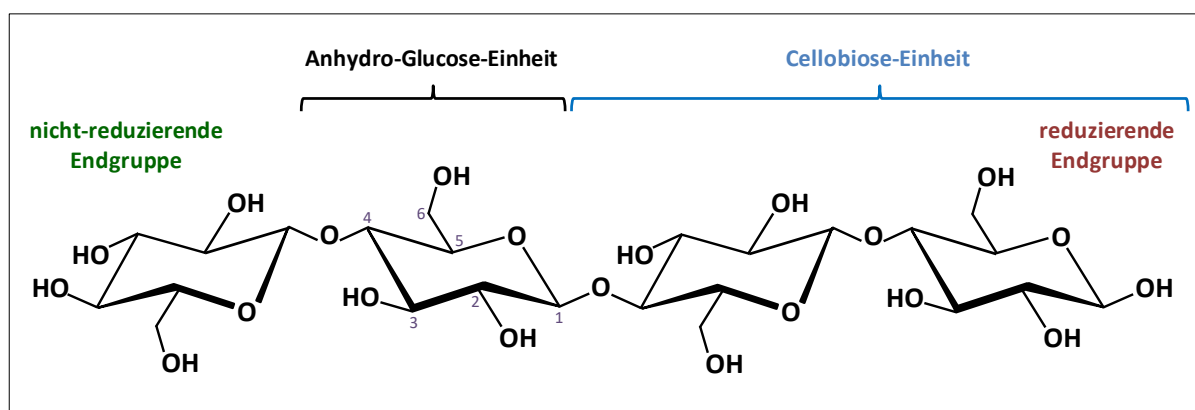


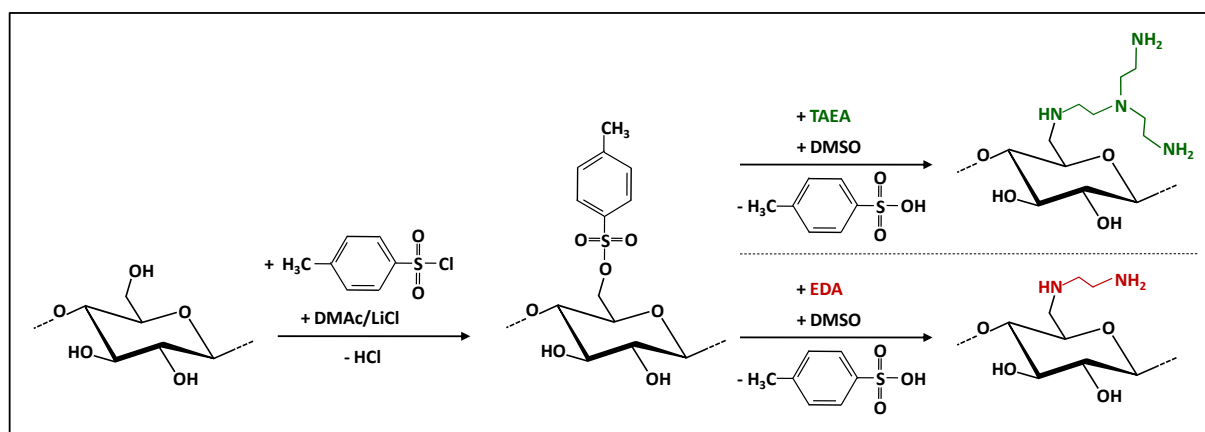
ABBILDUNG 1-1 Chemischer Aufbau von Cellulose.

Jede zweite AGU liegt entlang der Polymerkette aufgrund der  $\beta$ -Verknüpfung um  $180^\circ$  gedreht vor, sodass Cellobiose die Wiederholungseinheit von Cellulose darstellt. In jeder AGU sind die Hydroxylgruppen der Cellulose sekundär an den Kohlenstoffatomen C-2 und C-3 bzw. primär an der Position C-6 angeordnet<sup>46</sup>. Die beiden Hydroxylgruppen an beiden Polymerkettenenden verhalten sich unterschiedlich. Das C-1-Ende des Cellulosemoleküls weist reduzierende Eigenschaften auf,

wohingegen das C-4-Ende nicht-reduzierte Eigenschaften besitzt <sup>65</sup>. Die mittlere Anzahl, der in einem Cellulosemolekül enthaltenen AGU, wird als durchschnittlicher Polymerisationsgrad (DP) definiert.

Die Eigenschaft von Cellulose intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, erschwert die Zugänglichkeit der Hydroxylgruppen und resultiert in einer Unlöslichkeit in Wasser und in den meisten Lösungsmitteln. Durch chemische Behandlung können die Eigenschaften des natürlich vorkommenden Polymers modifiziert werden. Über Carbanilat-, Tosylat-, Acetyl-, Benzoyl- oder Methyl-Substituenten können löslichkeitsvermittelnde Gruppen an die AGU-Positionen C-2 und C-3 in das Cellulosemolekül eingefügt werden <sup>7</sup>. Das indirekte Einfügen von Aminogruppen in Cellulose erzeugt die sogenannte Aminocellulose.

In der homogenen Polymerchemie erfolgt die Synthese von Aminocellulose über das Lösen von mikrokristalliner Cellulose in einer Mischung aus Dimethylacetamid (DMAc) und Lithiumchlorid (LiCl). Bei mikrokristalliner Cellulose handelt es sich um eine aufbereitete und teilweise abgebaute Cellulose, welche u. a. unter der Bezeichnung Avicel® kommerziell erhältlich ist <sup>5</sup>. Durch homogene Umsetzung mit *p*-Toluensulfonsäurechlorid (TosCl) werden selektiv Tosylatgruppen an der AGU-Position C-6 eingeführt (Abbildung 1-2). Durch nukleophile Substitution in Dimethylsulfoxid (DMSO) werden die Tosylatgruppen durch Aminogruppen, wie beispielsweise Ethylendiamin (EDA) oder Triamtriethylamin (TAEA), ausgetauscht und das entstehende Produkt wird als 6-Deoxy-6-aminoalkyl Cellulose (AC) bzw. als Aminocellulose bezeichnet <sup>48</sup>.



**ABBILDUNG 1-2** Synthese von 6-Deoxy-6-aminoalkyl Cellulose mit Ethylendiamin (EDA, rot) bzw. Triamtriethylamin (TAEA, grün) als funktioneller Aminogruppe.

Mit der Tosylierung von Cellulose wird eine homogene Verteilung der funktionellen Gruppen im Polymerelement angestrebt <sup>91</sup>. Mit dem Substitutionsgrad (DS) wird der Grad der Verteilung an funktionellen Gruppen im Cellulosemolekül angegeben. Der DS kann Werte von 0 bis 3 annehmen, wobei der niedrigste Wert keiner Derivatisierung und der höchste Wert einer vollständigen Derivatisierung entsprechen <sup>70</sup>.

Funktionelle Gruppen verändern durch ihre charakteristischen Eigenschaften die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Moleküls, an welchem sie gebunden sind. So entstehen über den

beschriebenen Syntheseweg wasserlösliche AC mit kationischem und basischem Charakter. Die Löslichkeit der AC in Wasser ermöglicht die biologische Charakterisierung mit Hinblick auf Biokompatibilität und Biofunktionalität. Wasserunlösliche Polymere sind in ihrer biologischen Wirkung meist begrenzt <sup>8</sup>.

Aminogruppenhaltige Polysaccharide spielen eine wichtige Rolle in biologischen Systemen <sup>125</sup>. Im Außenskelett von Gliederfüßern und als Zellwandkomponente bei Pilzen findet man beispielsweise 2-Desoxy-2-aminoverbindungen. Aus diesen aminogruppenhaltigen Einheiten setzt sich das Biopolymer Chitin zusammen. Als deacetylierte Form des Chitins ist Chitosan ein bekanntes Untersuchungsobjekt in der Polymerchemie <sup>6</sup>.

Aufgrund der strukturellen Eigenschaften kann AC als ein synthetisches Chitosan angesehen werden. Für Chitosan konnte bereits eine antimikrobielle und hämostatische Wirksamkeit nachgewiesen werden <sup>3,6</sup>. Die Wirksamkeit des Chitosans beruht auf den protonierten Aminogruppen des Glucosamins. Diese können mit der negativ-geladenen mikrobiellen Zellwand interagieren, wobei die Wirkung vom Grad der Deacetylierung und dem Molekulargewicht abhängig und darüber hinaus auch dosisabhängig ist <sup>67</sup>. Die Verteilung von Deacetylierungsgrad und Molekulargewicht ist häufig inhomogen, aufgrund der chemischen Gewinnung des Chitosans. Dabei kann die Wirkung des Chitosans nicht wesentlich gesteuert werden. Man vermutet, dass die Wirksamkeit der AC ebenfalls auf den protonierten Aminogruppen beruht. Aufgrund der positiven Ladungen können die Aminogruppen der AC mit den negativ-geladenen Lipiden der mikrobiellen Zellmembran interagieren. Die genaue Funktionsweise der antimikrobiellen Aktivität von AC ist ein komplexer Prozess und im Detail noch nicht geklärt.

In Voruntersuchungen konnten für AC mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen, Ausgangscellulosen und DS-Werten die Zellverträglichkeit gegenüber HaCaT-Keratinocyten, die Hämkompatibilität sowie die antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber Bakterien und Pilze bestätigt werden <sup>14,37,96,104,120,127</sup>. Die Biofunktionalität und Biokompatibilität von AC mit definierten funktionellen Gruppen und DS-Werten in Co-Kulturmodellen aus humanen und mikrobiellen Zellen und in *Candida*-infizierten dreidimensionalen Hautmodellen wird erst mit der vorliegenden Arbeit charakterisiert. Mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen soll eine Grundlage für Anwendungen von AC im pharmazeutischen, kosmetischen und medizinischen Bereich geschaffen werden.

## 1.2 *Candida albicans* – ein Modellorganismus zur Prüfung der Biofunktionalität

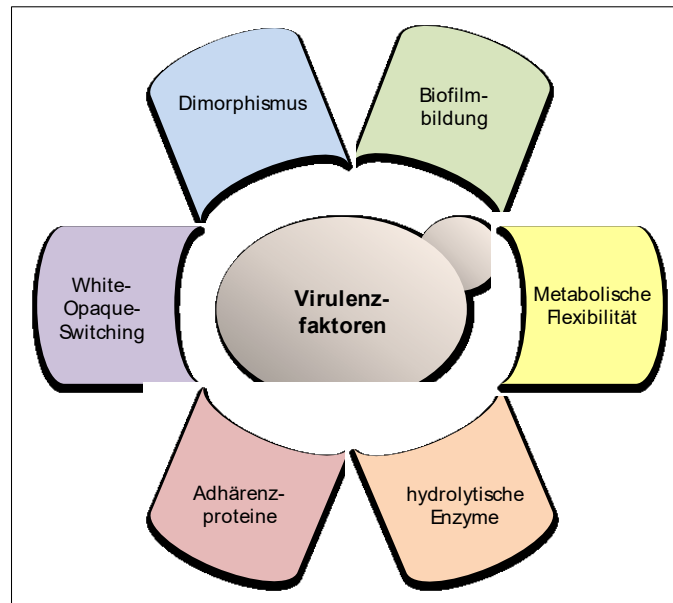
Der menschliche Körper ist äußerlich, als auch innerlich mit einer Vielzahl von harmlosen Mikroorganismen, den sogenannten Kommensalen besiedelt. Zu den Kommensalen der Nasen- und Mundschleimhäute, sowie des Gastrointestinal- und Vaginaltrakts zählen unter anderem Hefepilze der Gattung *Candida* <sup>41,61,87</sup>. Innerhalb dieser Gattung ist *Candida albicans* (*C. albicans*) einer der häufigsten Isolate aus klinischen Materialien <sup>90,114</sup>. *C. albicans* ist ein opportunistisch pathogener Pilz, welcher im Gegensatz zu anderen Pilzen hauptsächlich warmblütige Lebewesen asymptomatisch besiedelt <sup>15</sup>.

Unter bestimmten Umständen ist *C. albicans* in der Lage von der harmlosen kommensalen Form in die pathogene überzugehen und löst dabei sowohl oberflächliche, als auch invasive Infektionen aus <sup>100</sup>. Bei einem gesunden Menschen bilden eine intakte Hautbarriere und das Immunsystem einen sicheren Schutz vor *Candida*-Infektionen <sup>55,71</sup>. Risiken für *Candida*-Infektionen stellen unter anderem Vorerkrankungen, wie Diabetes mellitus, Krebserkrankungen und AIDS dar. Die Einnahme von Medikamenten, welche zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems bzw. zu einer Änderung in der Zusammensetzung der natürlichen Mikroflora führen, kann ein vermehrtes Wachstum von *C. albicans* und somit Candidosen begünstigen. Anfällig für *Candida*-Infektionen können auch Säuglinge, Schwangere, ältere Menschen mit einem schwachen Immunsystem und übergewichtige Menschen sein <sup>60,85,101</sup>. Lebensgefährlich kann es werden, wenn *Candida* in die Blutbahn gelangt und eine Sepsis auslöst oder innere Organe stark von dem Pilz befallen werden. Die Behandlung einer invasiven Candidose ist problematisch, da bei einer Diagnose der Erkrankung die Infektion meist zu weit fortgeschritten ist <sup>28</sup>. Die Bezeichnung Candidose wurde ursprünglich zur Beschreibung von Infektionen durch *C. albicans* beschrieben <sup>85</sup>. Mittlerweile werden unter diesem Begriff auch Infektionen zusammengefasst, welche auch durch andere *Candida*-Spezies ausgelöst werden. Trotz des stetigen medizinischen Fortschritts sind ca. 80 % aller nosokomialer Pilzinfektionen auf *Candida*-Spezies, insbesondere auf *C. albicans*, zurückzuführen <sup>95,100</sup>. Aufgrund der klinischen Relevanz, ist es von großer Bedeutung *C. albicans* im Detail zu erforschen, um beispielsweise die Lebensweise, Pathogenität, Interaktionen mit dem Wirtsorganismus und Resistenzentwicklung besser verstehen zu können.

Mit der Veröffentlichung der vollständigen Genom-Sequenz von *C. albicans* im Jahr 2004 wurde Wissenschaftlern der Weg für tiefgründige Forschungen auf DNA- und RNA-Ebene eröffnet <sup>60</sup>. Als Modellorganismus eignet sich *C. albicans* besonders, da dieser einzellige Mikroorganismus eine kurze Generationszeit und ein hohes Maß an metabolischer Flexibilität besitzt und sich daher im Labor ohne große Probleme anzüchten lässt. *C. albicans* weist eine hohe Anpassungsfähigkeit auf und kann schnell auf Veränderungen in der Umgebung reagieren <sup>55</sup>. So ist dieser opportunistische Mikroorganismus in der Lage in anatomisch und physiologisch unterschiedlichen Nischen im

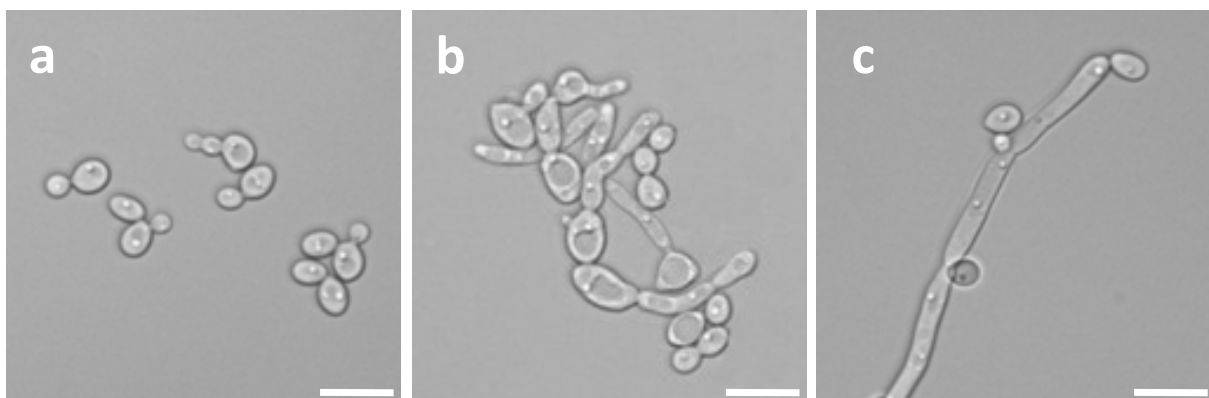
Wirtsorganismus zu überleben und hat eine Reihe von Faktoren entwickelt, mit welchen er bei Änderung der Umgebungsbedingungen seine Pathogenität entfalten kann.

Entscheidend für den Übergang zur pathogenen Form sind verschiedene Virulenzfaktoren (Abbildung 1-3).



**ABBILDUNG 1-3** Die Pathogenität von *C. albicans* wird durch das komplexe Zusammenwirken von Virulenzfaktoren bestimmt (in Anlehnung an da Silva Dantas et al. <sup>19</sup>).

In Abhängigkeit von äußeren Bedingungen, wie Temperatur, pH-Wert und CO<sub>2</sub>-Gehalt kann *C. albicans* zwischen verschiedenen morphologischen Formen wechseln. Am bedeutendsten für die Virulenz ist der Dimorphismus, dem Wechsel zwischen der Hefe- und der Hyphenform. Diese Fähigkeit ist innerhalb der *Candida*-Spezies des Weiteren nur bei *C. dubliniensis* zu finden. Neben Hefezellen und Hyphen (Abbildung 1-4 a und c) sind weitere morphologische Formen bei *C. albicans* möglich. Zu den weiteren Formen zählen Pseudohyphen (Abbildung 1-4 b), Chlamydosporen und die *opaque*-Form.



**ABBILDUNG 1-4** Morphologische Formen von *C. albicans*. *C. albicans* kann als Blastospore (Hefeform; a), Pseudohyphe (b) oder Hyphe (c) wachsen. Die Balkenlänge entspricht 10 µm.

Cutler führte anstelle von dimorph den Begriff pleomorph ein, um die Anzahl der verschiedenen Zellformen bei *C. albicans* treffender zu beschreiben<sup>18</sup>.

In der rundlich-ovalen Hefeform (auch Blastospore oder *white*-Form) kann sich *C. albicans* asexuell durch Sprossung vermehren. Fadenförmige Hyphen zeichnen sich durch ein kontinuierliches Wachstum aus und bestehen aus mehreren Zellen, welche durch Septen voneinander abgetrennt sind. Hinter diesen Septen können neue Blastosporen entstehen<sup>27</sup>. Pseudohyphen ähneln den echten Hyphen, hierbei bleiben jedoch die gestreckten Tochterzellen mit den Mutterzellen verbunden. An den terminalen Enden von Hyphen und Pseudohyphen können Chlamydosporen entstehen. Man vermutet, dass es sich bei diesen dickwandigen Zellen um Überdauerungsformen handelt<sup>85</sup>. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen morphologischen Formen ist mit der *opaque*-Form eine parasexuelle Vermehrung mit genetischer Rekombination möglich. Über das sogenannte White-Opaque-Switching findet ein spontaner reversibler Wechsel zwischen den weißen, kugeligen Kolonien (*white*-Form) zu grauen, langgezogenen Kolonien (*opaque*-Form) statt<sup>106</sup>. Dieser Mechanismus dient *C. albicans* vermutlich der Anpassung an verschiedene Nischen innerhalb des Wirtsorganismus<sup>76</sup>.

Die Fähigkeit zwischen der Hefe- und Hyphenform zu wechseln verschafft *C. albicans* Vorteile bei der Verbreitung innerhalb des Wirtsorganismus. Dabei haben Blastosporen den Vorteil, dass sie sich schnell durch Sprossung vermehren und leicht über die Blutbahn zu den Organen verteilt werden können<sup>18</sup>. Blastosporen spielen besonders im frühen Prozess einer Infektion eine entscheidende Rolle<sup>97</sup>. Hingegen ermöglichen adhärenzvermittelnde Proteine Hyphen das Anheften an Wirtszellen und infolge der Freisetzung hydrolytischer Enzyme wird das Durchdringen der Zellen hervorgerufen<sup>54,86</sup>. Zu den hydrolytischen Enzymen zählen sekretorische Proteinasen, extrazelluläre Phospholipasen und Lipasen mit welchen Zellmembranen und extrazelluläre Matrices des Wirtsorganismus zerstört werden, um in die Zellen eindringen zu können und um Nährstoffquellen zu erschließen<sup>60</sup>.

Eine weitere virulente Eigenschaft von *C. albicans* erschwert die Behandlung von Infektionen und beeinflusst die Effektivität des Immunsystems. *C. albicans* verfügt über die Fähigkeit komplexe Biofilme auszubilden. Bei der Bildung eines Biofilms adhäreren zunächst Hefezellen auf einer Oberfläche und bilden eine basale Schicht. Auf diese Schicht lagern sich Hyphen. Dabei entsteht ein komplexes Gebilde, welches nach außen von einer polymeren Matrix abgeschlossen wird<sup>23</sup>. Mit der Ausbildung von Biofilmen ist es *C. albicans* möglich biotische als auch abiotische Oberflächen (z. B. Katheter und Implantate) zu besiedeln und stellt damit eine große Herausforderung in der medizinischen Behandlung dar. Hinzu kommt eine hohe Resistenz der Biofilme gegen Antimykotika<sup>22,73</sup>.

Bei der Entwicklung neuer Antimykotika besteht die Problematik der Zunahme resistenter Pilzstämme infolge von Mutationen auf Seite der Mikroorganismen. Zudem stellt die Ähnlichkeit des Zellaufbaus und der zellulären Abläufe von *C. albicans* mit humanen Zellen aufgrund der gemeinsamen



Zugehörigkeit beider Organismen zu den Eukaryoten eine Herausforderung für die Angriffspunkte neuer antimikrobiell wirksamer Substanzen dar. Dabei wäre es vom Vorteil gezielt *C. albicans* zu hemmen bzw. abzutöten, ohne dass die humanen Zellen geschädigt werden und ein Ungleichgewicht in der natürlichen Mikroflora entsteht.

### 1.3 Humane Zellkulturmodelle zur Prüfung der Biokompatibilität

Isolierte Zellen menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs können in entsprechenden flüssigen Nährmedien außerhalb des Organismus kultiviert werden. Man unterscheidet zwischen primären Zellen und immortalisierten (permanenten) Zelllinien. Primäre Zellen werden direkt aus einem Gewebe oder Organ isoliert und besitzen im Vergleich zu permanenten Zelllinien eine eingeschränkte Lebensdauer. Bei permanenten Zelllinien handelt es sich um transformierte Zellen mit einer potentiellen Unsterblichkeit und sie werden meist aus Tumoren isoliert <sup>102</sup>.

In der Forschung finden Zellkulturen ein breites Anwendungsspektrum als leicht zu etablierende und robuste Modellsysteme. Bei der *in-vitro* Kultivierung von Zellen lassen sich reproduzierbare Experimente unter kontrollierbaren und standardisierbaren Bedingungen durchführen. Mit diesen Modellsystemen lassen sich z. B. bei der Arzneimittelforschung die Wirksamkeit, die Toxizität und der Mechanismus der Wirkung von Arzneistoffen aufklären <sup>77</sup>.

In der konventionellen Kultivierung von Zellen bedient man sich der zweidimensionalen (2d) Zellkultur. Die Zellkultur ist definiert als eine Kultivierung von Zellen, Gewebe- und Organteilen, Organanlagen und Organen außerhalb eines Organismus unter sterilen Bedingungen in einem künstlich geschaffenen Medium. Bei der 2d-Zellkultur unterscheidet man zwischen der Kultivierung von Suspensionszellen und adhärenenten Zellen. Bei der Kultivierung von Zellen in Suspensionsmedium haften die Zellen nicht am Zellkulturmaterial und diese Methode eignet sich nur für bestimmte Zellarten, wie z. B. Lymphozyten oder Mikroorganismen <sup>92,102</sup>. Im Gegensatz dazu haften adhärenente Zellen, z. B. Gewebszellen, auf der Oberfläche des Zellkulturgefäßes und bilden einen einschichtigen Monolayer aus. Die Zellen in 2d-Monolayer-Kulturen stellen ihr Wachstum ein, sobald ein dichter Zellrasen (Konfluenz) erreicht ist. Dann wird es notwendig die Zellen zu vereinzeln, um eine Zellkontakthemmung und eine damit einhergehende Abnahme der Proliferationsrate zu vermeiden. Dieser regelmäßige Vereinzelungsschritt wird als Passagieren bezeichnet.

In der dermatologischen Forschung sind Keratinozyten als *in-vitro* Modellsystem von besonderem Interesse, da diese mit 95 % den Hauptteil aller Zellen innerhalb der Epidermis ausmachen und die äußerste Barriere der Haut bilden. Ein geeignetes *in-vitro* Modell für Proliferations- und Differenzierungsuntersuchungen sind HaCaT-Keratinozyten. HaCaT-Keratinozyten werden häufig als Ersatz für primäre humane Keratinozyten (NHEK) verwendet, da sie eine hohe Immortalität (> 140 Passagen) aufweisen <sup>10,12</sup>. Sie haben den Vorteil, dass sie als permanente Zelllinie ihr Proliferationspotential und ihre biochemische Leistungsfähigkeit über das häufige Passagieren

weitestgehend beibehalten und sie annähernd gleiche Differenzierungseigenschaften aufweisen, wie humane Keratinozyten<sup>75</sup>. Die Bezeichnung HaCaT-Keratinozyten setzt sich zusammen aus der Abkürzung für *Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes*. Diese Bezeichnung beschreibt die Herkunft der Zellen und die Anforderungen bei der Etablierung der Zelllinie. HaCaT-Keratinozyten sind eine permanente, epitheliale humane Zelllinie, welche nicht tumorigen, aber phänotypisch als spontan transformierend bekannt ist<sup>10</sup>. Sie wurden aus der Peripherie eines primären malignen Melanoms auf der oberen Rückenhaut eines 62-jährigen Patienten isoliert. Die HaCaT-Zelllinie wurde umfangreich von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fusenig am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg charakterisiert.

Beachtet man, dass im menschlichen Körper Zellen in komplexen Zellverbänden vorkommen, so lassen sich mit 2d-Zellkulturmodellen nur unzureichende Rückschlüsse in Hinsicht auf *in-vivo* Verhältnisse ergründen. Die Ergebnisse dieser Modellsysteme lassen sich nur bedingt auf einen lebenden Organismus übertragen. Herausgelöst aus ihrem ursprünglichen Zellverband verlieren sie gewebsspezifische Eigenschaften<sup>77</sup>. Im Organismus ordnen sich Zellen räumlich in einer extrazellulären Matrix an, diese fehlt neben den Zell-Zell-Kontakten in 2d-Zellkulturmodellen. Die extrazelluläre Matrix ermöglicht grundlegende Prozesse, wie Adhäsion, Wachstum und Migration.

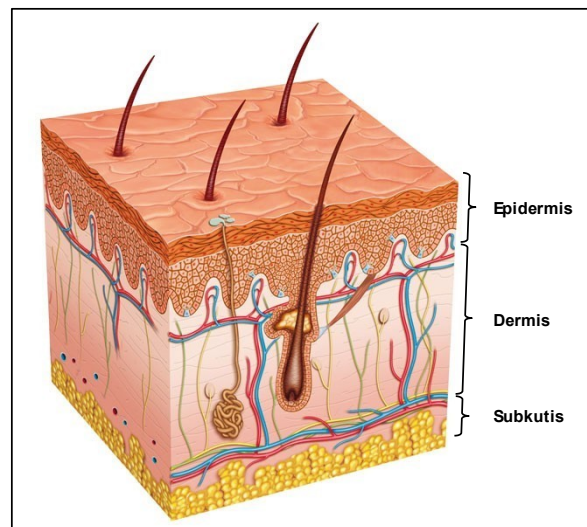
Mit dreidimensionalen (3d) Zellkulturen lassen sich *in-vivo* Bedingungen realistischer abbilden. 3d-Zellkulturen werden auch als organotypische Gewebekulturen bezeichnet. Zum Verständnis von biologischen und biochemischen Prozessen eignen sich organoide Strukturen und multizelluläre Verbände besser als 2d-Zellkulturen, um physiologische Vorgänge innerhalb und außerhalb von Zellen besser verstehen zu können<sup>1,11,88</sup>. In der modernen medizinischen und biochemischen Forschung, als auch in der kosmetischen und pharmazeutischen Industrie erlangen 3d-Zellkulturen eine zunehmende Bedeutung<sup>11,107</sup>.

Bei den 3d-Zellkulturmodellen kann man in zwei Gruppen unterscheiden. Zum einen können die Zellen auf einem Grundgerüst tierischen oder synthetischen Ursprungs basieren. Zum anderen unterscheidet man in 3d-Modelle ohne derartiges Grundgerüst, bei denen sich Zellen zu kompakten, kugelförmigen Aggregaten, den Sphäroiden, anordnen. In der Tumorzellforschung finden 3d-Sphäroidmodelle häufig Anwendung<sup>74</sup>. Bei dieser Form der Kultivierung wird das Kulturmedium unter Rühren in Bewegung gehalten, damit sich die Zellen nicht am Boden des Zellkulturgefäßes absetzen. Das Ziel sind sphärische Zellaggregate, welche viele ihrer ursprünglichen biochemischen und morphologischen Eigenschaften beibehalten.

Einen weiteren Schritt in Richtung natürlichen Zellverband gehen 3d-Organmodelle. Hierbei werden beispielsweise Stammzellen, primäre Zellen oder Zelllinien verwendet, um außerhalb eines Organismus Gewebe oder Organe im Labormaßstab zu züchten und auf verschiedene Fragestellungen hin zu untersuchen<sup>1</sup>. Zur Untersuchung von Medikamenten finden bereits 3d-Organmodelle der Leber und der Niere humanen Ursprungs immer häufiger Anwendung<sup>26</sup>.

Im Hinblick auf die Problematik der Versuchstierforschung kann mit Hilfe von 3d-Hautmodellen die Notwendigkeit von Tierversuchen im Bereich der dermatologischen und pharmazeutischen Forschung reduziert werden, da beispielsweise Vollhautmodelle der Physiologie und Anatomie der menschlichen Haut näher sind, als die Haut von Tieren <sup>24</sup>.

Als größtes menschliches Organ stellt die Haut eine äußere Barriere zum Schutz vor äußeren Einflüssen, wie beispielsweise toxischen Substanzen, Pathogenen und anderen Mikroorganismen, dar. Bei der Haut lassen sich drei Schichten unterscheiden (Abbildung 1-5).



**ABBILDUNG 1-5** Aufbau der menschlichen Haut (verändert nach <sup>69</sup>).

Die äußerste Schicht bildet die Epidermis, welche hauptsächlich aus Keratinozyten besteht. Die Keratinozyten lassen sich in diesem mehrschichtigen Epithel entsprechend ihrer Differenzierung in verschiedene Kompartimente einteilen. Dazu zählen Stratum corneum (Hornschicht), Stratum granulosum (Körnerzellschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und Stratum basale (Basalschicht). An die Epidermis grenzt nach Innen die Dermis. In dieser Schicht zählen Fibroblasten zur dominierenden Zellart. Diese produzieren Zytokine, Wachstumsfaktoren, Kollagen, Elastin, Proteoglykane, Glykoproteine und Hyaluronsäure. Die Dermis bildet ein Gerüst aus Bindegewebe, in welchem versorgende Nerven und kleine Blutgefäße eingebettet sind. Das Fettgewebepolster, die Subkutis, bildet die unterste Schicht der Haut und ist mit größeren Blutgefäßen, Nerven und Lymphgefäßen durchzogen.

Bei den 3d-Hautmodellen unterscheidet man zwischen drei Modelltypen. Es gibt Modellsysteme, welche mit NHEK oder HaCaT-Keratinozyten nur eine epidermale Komponente aufweisen <sup>16,103</sup>. Des Weiteren sind Modelle beschrieben, welche wiederum mit normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) nur eine dermale Komponente aufweisen <sup>25</sup>. Und es gibt Modellsysteme, welche eine Dermis und eine Epidermis besitzen und als Vollhautmodelle bezeichnet werden <sup>13,38</sup>. Vollhautmodelle und 3d-Hautmodelle, welche nur aus einer Dermis bestehen, besitzen eine Matrix, in welche Fibroblasten

eingebettet sind. Die Fibroblasten können sich in einer Matrix aus Kollagen, Glucosaminoglykanen, Fibrin, Hyaluronsäure oder Chitosan befinden<sup>38,81</sup>. Mittlerweile sind Hautmodelle in vielen Variationen kommerziell erhältlich<sup>13,119,126</sup>.

Hautmodelle finden Anwendung als Forschungsgrundlage für pharmakotoxikologische Untersuchungen zur Evaluierung von Zytotoxizitäts-, Permeabilitäts- und Penetrationstests. Weiterhin sind sie für die Grundlagenforschung zur Physiologie der Haut unentbehrlich für die Erforschung von Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen, als auch für Studien zur Wundheilung oder zur Untersuchung verschiedener dermaler Krankheitsbilder. Zum anderen kann mit *in-vitro* hergestellter Haut Patienten mit starken Verbrennungen oder chronischen Wunden ein artifizieller Hautersatz zur Behandlung angeboten werden<sup>81</sup>.

## 1.4 Biokompatibilität und Biofunktionalität

Biokompatibilität und Biofunktionalität spielen eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung und Beurteilung von Substanzen und Produkten, welche bei Anwendungen am Menschen direkten oder indirekten Kontakt zum menschlichen Körper haben. Dabei werden an diese Substanzen und Produkte hohe Anforderungen gestellt. So dürfen diese u. a. keine schädlichen Einflüsse und Risiken aufweisen. In der DIN EN ISO 10993 werden Anforderungen zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten zusammengefasst und bilden eine allgemeingültige rechtliche Grundlage.

Die Beurteilung der Biokompatibilität erfolgt anhand von Hämokompatibilitäts-, Proliferations- und Zytotoxizitätsanalysen *in-vitro* an menschlichen und tierischen Zellen.

In dieser Arbeit werden die Begriffe zur Charakterisierung der AC im Zusammenhang mit humanen Zellen und Mikroorganismen verwendet und werden wie folgt definiert. Der Begriff Biokompatibilität bezieht sich auf die Verträglichkeit der AC gegenüber humanen Zellen. Wohingegen die Biofunktionalität die Wirkung der AC gegen Mikroorganismen beschreibt. So ist bei den zu untersuchenden AC eine hohe Zellverträglichkeit neben einer antimikrobiellen Wirksamkeit für Anwendungsmöglichkeiten im medizinischen Bereich von großer Bedeutung.

Um die Biokompatibilität und Biofunktionalität der AC miteinander vergleichen zu können, wurde in Anlehnung an Müller und Kramer ein Biokompatibilitätsindex (BI) definiert<sup>82</sup>. Bei Müller und Kramer berechnet sich der BI anhand der Konzentration, bei der 50 % der untersuchten Mausfibroblasten infolge der Inkubation mit silberhaltigen Wundantiseptika geschädigt sind, und der Reduktion des bakteriellen Wachstums von *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* um mindestens fünf log-Stufen<sup>82</sup>.

In einer, während dieser Arbeit veröffentlichten Studie, wird die Berechnung des BI (Formel 1-1) als Verhältnis der halbmaximalen letalen Konzentration (LC<sub>50</sub>) zur halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC<sub>50</sub>) beschrieben<sup>37</sup>.

$$BI = \frac{LC_{50}}{IC_{50}}$$

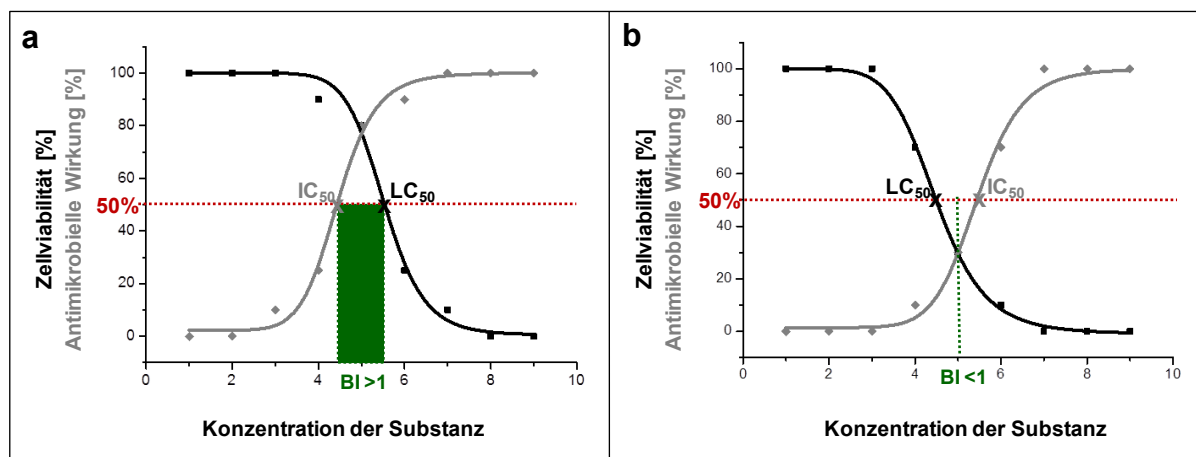
**FORMEL 1-1** Der Biokompatibilitätsindex  $BI$  berechnet sich aus dem Verhältnis von der halbmaximalen letalen Konzentration  $LC_{50}$  zur halbmaximalen inhibitorischen Konzentration  $IC_{50}$ .

Der  $LC_{50}$ -Wert gibt hierbei eine AC-Konzentration an, bei welcher 50 % der HaCaT-Keratinocyten *in-vitro* lebensfähig sind. Mit Hilfe einer Dosis-Wirkungskurve wird die Abhängigkeit der Viabilität der HaCaT-Keratinocyten von der Konzentration einer AC dargestellt. Dabei entspricht der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve dem  $LC_{50}$ -Wert. Dessen Berechnung leitet sich dabei von der Formel der Kurve ab (Formel 1-2). Die Berechnung des  $IC_{50}$ -Wertes beruht auf der gleichen Formel, wie sie zur Berechnung des  $LC_{50}$ -Wertes verwendet wird. Jedoch gibt der  $IC_{50}$ -Wert die AC-Konzentration an, bei welcher 50 % der *C. albicans*-Zellen in ihrem Wachstum gehemmt bzw. abgetötet sind.

$$y = \frac{A2 + (A1 - A2)}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$

**FORMEL 1-2** Anhand der Formel für die Dosis-Wirkungskurven kann der  $LC_{50}$ - bzw. der  $IC_{50}$ -Wert berechnet werden.  $A1$  – obere Grenze,  $A2$  – untere Grenze,  $p$  – Steigung der Kurve,  $x$  – AC-Konzentration,  $x_0$  –  $LC_{50}$  bzw.  $IC_{50}$ ,  $y$  – Viabilität bzw. antimikrobielle Wirksamkeit.

Abbildung 1-6 veranschaulicht die Bedeutung des Verhältnisses von  $LC_{50}$  zu  $IC_{50}$  für den BI. In dieser Abbildung sind exemplarisch zwei Möglichkeiten anhand von Dosis-Wirkungskurven dargestellt. So definiert ein  $BI > 1$  eine Substanz mit einer hohen antimikrobiellen Wirkung und einer gleichzeitig hohen Zellverträglichkeit (Abbildung 1-6 a). Bei einem  $BI < 1$  ist die Substanz zwar antimikrobiell wirksam, aber die Verträglichkeit gegenüber humanen Zellen ist gering (Abbildung 1-6 b).



**ABBILDUNG 1-6** Veranschaulichung des Biokompatibilitätsindex (BI).

## 1.5 Zielstellung

Diese Arbeit befasst sich mit der Frage nach der Verträglichkeit unterschiedlich funktionalisierter AC gegenüber humanen Zellen und Zellverbänden, sowie der Wirksamkeit gegenüber dem Hefepilz *C. albicans*. Vielfältige Untersuchungen sollen dabei Rückschlüsse bezüglich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen von AC ermöglichen. Bisher sind die biologischen Eigenschaften der AC in Hinblick auf das Zusammenwirken der antimikrobielle Wirkung und der Zellverträglichkeit nicht charakterisiert. Entscheidend für die biologischen Eigenschaften der AC könnten der Polymerisationsgrad, der Tosylierungsgrad, aber auch die Beschaffenheit der Aminogruppe sein.

Im Vorfeld dieser Dissertation wurden AC mit unterschiedlichen Ausgangscellulosen, funktionellen Gruppen und DP hinsichtlich ihrer Zellverträglichkeit gegenüber HaCaT-Keratinocyten und ihrer antimikrobiellen Wirkung gegenüber pathogenen Bakterien untersucht. Hierbei konnte zunächst bestätigt werden, dass AC zellverträglich und antimikrobiell wirksam sein können, wobei die Biokompatibilität und Biofunktionalität der AC abhängig von der Beschaffenheit der funktionellen Gruppe sind. Dahingegen hatte die Beschaffenheit der Ausgangscellulose keinen Einfluss.

Aufgrund ihrer hohen Zellverträglichkeit und dem hohen antimikrobiellen Potential wurden für diese Arbeit AC mit EDA- bzw. TAEA-Funktionalisierung auf Basis einer Avicel-Cellulose als Ausgangscellulose gewählt. Da vermutet wird, dass der DS eine entscheidende Rolle bei der Biokompatibilität und Biofunktionalität von AC spielt, wurden definierte DS-Werte generiert. Diese Vermutung soll anhand etablierter und neu entwickelter Untersuchungsmethoden überprüft werden. Dabei sollen Fragen bezüglich der Biokompatibilität von AC an der etablierten HaCaT-Keratinocyten-Zelllinie geklärt werden. Die antimikrobielle Wirksamkeit soll mit Hinblick auf die Biofunktionalität an dem gut erforschten Modellorganismus *C. albicans* untersucht werden. Als Verknüpfung von Mikroorganismen und humanen Zellen soll die Wirkung der AC in 2d-Co-Kulturmodellen aus HaCaT-Keratinocyten und *C. albicans* untersucht werden. Mit Hilfe dieser Modelle kann die Wirksamkeit bzw. Verträglichkeit im Zusammenspiel von humanen Zellen und Mikroorganismen zunächst *in-vitro* betrachtet werden. Um wirklichkeitsnahe Bedingungen darstellen zu können, eignen sich besonders 3d-Hautmodelle. Diese Hautmodelle zeichnen sich durch eine gute Übereinstimmung mit humaner Epidermis und der Expression von wichtigen epidermalen Differenzierungsmarkern aus. Für diese Untersuchungen werden eigens Hautmodelle, bestehend aus einer Dermis und Epidermis mit Hornschicht, im Labormaßstab hergestellt, um Erkenntnisse über die Wirkung der AC im komplexen *in-vivo*-ähnlichen Zusammenhang zu erhalten.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

In den nachfolgenden Tabellen sind die, in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgelistet.

TABELLE 2-1 Zellen, Zellkulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
HaCaT-Keratinocyten	DKFZ Heidelberg, Prof. Dr. N. E. Fusenig
DMEM High Glucose; 4,5 g/l	BioConcept Ltd. AMIMED
Dulbecco's PBS; ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$	BioConcept Ltd. AMIMED
EDTA (Versen); 1 %	Biochrom
FKS	PromoCell
Gelneutralisationslösung	Frauenhofer Institut Stuttgart
Gentamycin	Gibco
hFGF	Novoprotein
Insulin, human (rek.); 5 mg/ml	BioConcept Ltd. AMIMED
Keratinocyte Basal Medium 2	PromoCell
Keratinocyte Growth Medium Kit low BPE	PELOBiotech
<i>Candida albicans</i> DSM 1386	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
<i>Candida albicans</i> ATCC MYA-2876	American Type Culture Collection (ATCC)
Sabouraud-Glukose-Bouillon	Merck
SDA-Platten	bioMérieux

TABELLE 2-2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
CASYton	OLS OMNI Life Science
Chlorhexidindigluconat	Sigma-Aldrich
Einbettmedium	Histofluid
Ethidiumhomodimer-2	MoBiTec
Formalin-Lösung; 4 %-ig, gepuffert, pH 7,4	Dr. K. Hollborn & Söhne
Gelneutralisationslösung	Frauenhofer Institut Stuttgart
Gentamycin	Gibco
Glutaraldehyd; 25 %	Serva
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Natriumcacodylat	Serva
Paraffin	Merck
PrestoBlue	Life Technologies
Proteinase-K Lösung	AppliChem GmbH
Rattenschwanz-Kollagen	Frauenhofer Institut Stuttgart
RNAse-freies Wasser	Roth
SYTO 13	MoBiTec
TMB Substrat	Sigma Aldrich
Triton-X100	Ferak
Trypsin-EDTA	Gibco
Xylol	Roth



**TABELLE 2-3** Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen. Puffer und Lösungen, welche Bestandteile eines kommerziell-erhältlichen Kits oder Assays sind, sind nicht aufgelistet.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Airliftmedium	Keratinocyte Basal Medium 2 mit 5 µg/ml Insulin 10 µg/ml Transferin 0,33 µg/ml Hydrocortison 0,39 µg/ml Epinephrine 1,88 mM CaCl <sub>2</sub> 5 % FKS 1 % Gentamycin
Cacodylatpuffer	0,1 M Natriumcacodylat pH 7,4
ELISA-Blockpuffer	PBS mit 0,1 % BSA
ELISA-Waschpuffer	PBS mit 0,05 % Tween 20
Fibroblasten-Medium	DMEM mit 2 % FKS 5 ng/ml hFGF 5 µg/ml Insulin
Flutmedium	DMEM mit 10 % FKS und 50 µg/ml Gentamycin
HBSS-Puffer	7,89 g/l NaCl 0,37 g/l KCl 0,25 g/l MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,26 g/l CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 2,38 g/l HEPES pH 7,4
Keratinocyten-Medium	Keratinocyte Basal Medium 2 mit 5 µg/ml Insulin 10 µg/ml Transferin 4 µl/ml Bovine 0,125 ng/ml Epidermal Growth Factor 0,33 µg/ml Hydrocortison 0,39 µg/mL Epinephrine 0,06 mmol/l CaCl <sub>2</sub>
Stopplösung	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

TABELLE 2-4 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank; Mikrobiologie	Memmert
Brutschrank, MCO-20AIC; Zellbiologie	Sanyo Electric
CASY Cell Counter, Modell TT	Schärfe-System
diverse Pipetten	Eppendorf, Brand, Greiner Bio-one
FLUOstar Omega	BMG LABTECH
Histokinette, Shandon Exelsior ES	Thermo Fisher Scientific
IHC-Färbeautomat, BenchMark GX	Roche
Kugelmühle	Retsch Laborgeräte
Kühlzentrifuge	Eppendorf
LUMIstar Galaxy	BMG LABTECH
Mikroskop, Axioskop	Zeiss
Mikroskop, CK2	Olympus
Mikrotom, RM 2255	Leica
NEPHELOstar Galaxy	BMG LABTECH
NOVostar Galaxy	BMG LABTECH
Orbitalschüttler	BMG LABTECH
PCR-Gerät, Mastercycler Gradient	Eppendorf
PHERASTAR Galaxy	BMG LABTECH
Pipettierhilfe	Eppendorf, Brand
Plattenschüttler	VWR
Plattenzentrifuge	Eppendorf
Real-Time PCR-Gerät, Rotor-Gene Q	Qiagen
Schüttelwasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik
Thermocycler	Eppendorf
Tischzentrifuge	Eppendorf
Vortex	IKA
Waage	Sartorius

TABELLE 2-5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
CASY cups	Schärfe-System
diverse Pipettenspitzen	Brand, Eppendorf
Drigalskyspatel	VWR International
Impföse	Greiner bio-one
Kanülen, Sterican Ø 1,2 mm	B. Braun
Kulturflasche, 50 ml mit Kapsenberg-Kappen	VWR International
Microplate, MaxiSorp, 96 Well, weiß	Nunc
Microplate, 96 Well, F-Boden, klar	Greiner bio-one
Microplate, 96 Well, F-Boden, schwarz	Greiner bio-one
Microplate, 384 Well	Greiner bio-one
Reaktionsgefäße, 0,5 ml	Qiagen
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Qiagen, Sarstedt
Reaktionsgefäße, 2 ml	Eppendorf, Sarstedt
Reaktionsgefäße, 5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße, 15 ml	Greiner bio-one
Reaktionsgefäße, 50 ml	Greiner bio-one
Stahlkugeln	Retsch Laborgeräte
Thincert Platte, 12 Well, klar	Greiner bio-one
Thincert Zellkultureinsatz für 12 Well Platten, Porendurchmesser: 8 µm	Greiner bio-one
Viewseal Abdeckfolie	Greiner bio-one
8-Well-Objektträger	Nunc
Zellkulturflasche, 250 ml, 75 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one

TABELLE 2-6 Kits und Assays

Bezeichnung	Hersteller
ABEL® Antioxidant Test Kit mit Pholasin® für Peroxynitrit	Knight Scientific Limited
ABEL® Antioxidant Test Kit mit Pholasin® für Superoxid und andere freie Radikale	Knight Scientific Limited
AMES MPF™ 98/100 Aqua	Xenometrix
ATPLite™-M Assay	Perkin Elmer
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	Promega
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega
Human IL-1 alpha/IL-1F1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems
Human IL-6 ELISA development kit (HRP)	Mabtech
Human IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
innuPrep RNA Mini Kit	Analytik Jena
Microbank™	Pro-Lab Diagnostics
One-Step Kit	Applied Biosystems
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
PrestoBlue® Cell Viability Reagent	Thermo Fisher Scientific
Rapid Endotest Five Research Samples	Lonza
ZR-96 Quick-gDNA™	Zymo Research

TABELLE 2-7 Primersequenzen und Referenzen; hergestellt von Eurofins

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
<b>gDNA-Primer</b>	
ITS1-2_for	AACAACGGATCTCTTGGTTCTC
ITS1-2_rev	GAAACGACGCTCAAACAGGCAT
<b>RNA-Primer</b>	
hBD-3_for	AGCCTAGCAGCTATGAGGATC
hBD-3_rev	CTTCGGCAGCATTTTGCGCCA
LL-37_for	ACCCAGCAGGGCAAATCTC
LL-37_rev	GAAGGACGGGCTGGTGAAG
IL-1 $\alpha$ _for	CGCCAATGACTCAGAGGAAGA
IL-1 $\alpha$ _rev	AGGGCGTCATTCAGGATGAA
IL-1 $\beta$ _for	GGACAAGCTGAGGAAGATGC
IL-1 $\beta$ _rev	TCCATATCCTGTCCCTGGAG
IL-6_for	CCACCGGGAACGAAAGAGAA
IL-6_rev	GAGAAGGCAACTGGACCGAA
IL-8_for	ATGACTTCCAAGCTGGCCGT
IL-8_rev	TCCTTGGCAAACTGCACCT
IL-18_for	GCTGAAGATGATGAAAACCTGGAA
IL-18_rev	AAATATGGTCCGGGGTGCATT
<b>Referenzgen</b>	
$\beta$ -Aktin_for	CCAACCGCGAGAAGATGA
$\beta$ -Aktin_rev	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

## 2.2 Aminocellulose

In dieser Arbeit wurden vier AC auf ihre antimikrobielle Wirkung und auf ihre Biokompatibilität in zwei- und dreidimensionalen Modellen untersucht. Die AC wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Heinze, Institut für Organische und Anorganische Chemie in Jena hergestellt und zur Verfügung gestellt.

### 2.2.1 Herstellung

Nach Tosylierung der mikrokristallinen Cellulose Avicel wurde die entstandene Tosylcellulose für die Herstellung der AC verwendet. Je 2,5 g der Tosylcellulose wurden in 30 ml DMSO gelöst und mit 25 mol pro mol AGU EDA bzw. TAEA versetzt und für 6 h bei 100 °C gerührt. Im Falle der AC mit TAEA-Funktionalisierung wurde das Gemisch aus Tosylcellulose und TAEA für 6 h unter Argon bei 100 °C gerührt. Alle AC lagen als 1 %-ige (10 mg/ml) Stammlösungen vor. Davon ausgehend wurden für die nachfolgenden Untersuchungen Verdünnungen in entsprechenden Kultivierungsmedien bzw. Pufferlösungen hergestellt.

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurde, ausgehend von Avicel, eine fluoreszierende AC hergestellt. Dazu wurde 1 g Dansylcellulose in 20 ml DMSO gelöst und mit 25 mol pro mol AGU EDA versetzt und für 6 h bei 100 °C gerührt. Diese AC lag als 0,5%-ige Lösung vor.

Tabelle 2-8 gibt einen Überblick über die chemischen Eigenschaften der getesteten AC.

TABELLE 2-8 Eigenschaften der verwendeten AC.

Bezeichnung	Ausgangscellulose	Funktionelle Gruppe	Substitutionsgrad
AC-EDA <sub>0,45</sub>	Avicel (DP <sub>w</sub> = 330)	EDA	0,45
AC-EDA <sub>0,55</sub>		EDA	0,55
AC-TAEA <sub>0,35</sub>		TAEA	0,35
AC-TAEA <sub>0,56</sub>		TAEA	0,56
fluoreszierende AC		EDA	1,4

### 2.2.2 Nachweis auf Endotoxine

Mit dem Rapid Endotest der Firma Lonza auf Grundlage des kinetisch-chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Tests wurden die vier AC auf mögliche Verunreinigungen mit Endotoxinen untersucht. Für diesen Test wurden pyrogenfreie Verbrauchsmaterialien verwendet. Zu Beginn des Tests wurde das Kontroll-Standard-Endotoxin in LAL-Reagenzwasser gelöst und anschließend zur Herstellung einer Endotoxin-Standardkurve verwendet. Von den AC wurden die Verdünnungen 1:100, 1:1000 und 1:10000 in LAL-Reagenzwasser mit Glukanblocker hergestellt.

Jede Probe wurde zusätzlich mit 0,5 Endotoxineinheiten pro ml Endotoxin (EU/ml) als positive Produktkontrolle (PPC) getestet, um eine mögliche Hemmung bzw. Verstärkung der Reaktion durch AC ausschließen zu können.

In eine 96-Well Mikrotiterplatte (MTP) wurden in entsprechende Wells je 100 µl Endotoxin-Standards, Negativ- und Positiv-Kontrolle, als auch AC-Verdünnungen in Doppelbestimmung pipettiert. Nachdem die MTP zunächst für 10 min bei 37 °C vorinkubiert wurde, wurden zu jedem Well 100 µl gelöstes LAL zugegeben. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte im Absorptionsmessgerät bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Inkubationstemperatur von 37 °C. Mithilfe einer Endotoxin-Standardkurve wurde der Endotoxingehalt der AC auf Grundlage der Reaktionszeiten berechnet.

### 2.2.3 Mutagenitätsuntersuchung

Die AC wurden mit einem Ames-Testkit der Firma Xenometrics hinsichtlich einer möglichen mutagenen Wirkung überprüft. Hierfür wurden zunächst Übernachtskulturen der genetisch veränderten Bakterienstämme *Salmonella typhimurium* TA98 und TA100 hergestellt. Dazu wurden die bei -80 °C gelagerten Bakterienstämme für 5 min bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut. Die Bakterienpellets wurden in 200 µl des mitgelieferten Growth Mediums homogenisiert. Je 25 µl der Bakteriensuspensionen wurden in 10 ml Growth Medium mit 50 µg/ml Ampicillin gegeben und für 14 h bis 16 h bei 37 °C und 250 min<sup>-1</sup> schüttelnd kultiviert. Am nächsten Tag wurde die OD der Bakterienkulturen bei 600 nm im FLUOstar Omega gemessen. Nur Bakterienkulturen mit einer  $OD_{600\text{ nm}} > 2,0$  wurden für die weiteren Durchführung verwendet.

In einer 24-Well MTP wurden die jeweilig zu testenden AC mit sterilem Wasser 1:2 verdünnt. Hierbei wurden sechs Verdünnungen einer AC hergestellt. Als Negativ-Kontrolle wurde steriles Wasser verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde je nachdem, ob mit oder ohne S9-Mix getestet wurde, eine andere Kontroll-Lösung verwendet. Bei einem Ansatz mit S9-Mix wurde 125 µg/ml 2-Aminoanthracen als Positiv-Kontrolle verwendet. Eine Mischung aus 100 µg/ml 2-Nitrofluoren und 5 µg/ml 4-Nitroquinolin wurde als Positiv-Kontrolle ohne S9-Mix verwendet.

Für die Ansätze wurden je 15 µl steriles Wasser (ohne S9-Mix) bzw. 15 µl S9-Mix in alle Wells einer 24-Well MTP (Exposure-Platte) gegeben. Die Wells aller MTP wurden weiterhin mit 25 µl 10x Exposuremedium gefüllt. Es wurden je 185 µl aus den Wells der MTP mit den AC-Verdünnungen und den Kontrolllösungen in die Exposure-Platten überführt. Anschließend wurden zu jedem Well 25 µl der TA98- bzw. 25 µl der TA100-Bakterienkultur hinzugegeben. Die Exposure-Platten wurden mit Deckeln verschlossen und für 90 min bei 37 °C auf einem Schüttler bei 250 min<sup>-1</sup> inkubiert. Nachdem zu jedem Well 2,8 ml Indicator-Medium pipettiert wurden, wurden je 50 µl aus den Wells der Exposure-Platten in die Wells von 384-Well MTP überführt. Die Platten wurden mit Deckeln abgedeckt und in einer großen Plastiktüte im Brutschrank bei 37 °C für 48 h inkubiert.

### 2.2.4 Inhibition von ROS und RNS

Die antioxidative Wirkung der AC gegenüber den freien Radikalen Superoxidanion (reactive oxygen species, ROS) und Peroxynitrit (reactive nitrogen species, RNS) wurde mit Testkits der Firma ABEL bestimmt. Zur Bestimmung der antioxidativen Wirkung gegenüber ROS wurde zunächst Pholasin in R&A-Puffer gelöst. Anschließend wurden 15 µl des R&A-Puffers mit 10 µl der jeweiligen AC-Lösung in einer weißen MTP vermischt. Zu diesem Gemisch wurden 50 µl des gelösten Pholasis und 100 µl Lösung A hinzugegeben. Zu Beginn der luminometrischen Messung im NOVOstar Galaxy wurden in jedes Well 25 µl Lösung B injiziert.

Im Fall der antioxidativen Bestimmung von RNS wurden jeweils 90 µl R&A-Puffer mit 10 µl AC-Lösung versetzt. Im Anschluss wurden 50 µl gelöstes Pholasin dazu gegeben. Nach automatischer Injektion von 50 µl SIN-1-Lösung erfolgte die Messung bei RT im NOVOstar Galaxy.

## 2.3 Kultivierung humaner Zellen und Mikroorganismen

Die Arbeitsschritte, welche in den nächsten Abschnitten beschrieben werden, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die folgenden humanen Zellen wurden über längere Zeiträume in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Zur Kultivierung wurden die humanen Zellen zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend vorsichtig in das entsprechende Kulturmedium pipettiert. Die Kultivierung erfolgte in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bei 37 °C und einer 5 %-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank. Nach 24 h erfolgte ein erster Wechsel des Kulturmediums, welcher anschließend alle zwei Tage wiederholt wurde.

### 2.3.1 HaCaT-Keratinocyten

Zur Versuchskultivierung wurden HaCaT-Keratinocyten über sieben Tage in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) kultiviert, welches mit 10 %-igem fetalem Kälberserum (FKS) supplementiert wurde. Nachdem das Zellkulturmedium vollständig abgesaugt wurde, wurde der HaCaT-Keratinocytenmonolayer zweimal vorsichtig mit 37 °C warmem PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Nach ca. 5 min wurde der Trypsinierungsvorgang durch Zugabe von DMEM abgestoppt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem DMEM aufgenommen und die Zellzahl wurde ermittelt. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension in 10 ml CASYton gegeben und am CASY Cell Counter vermessen. Für die Zellverträglichkeitsuntersuchungen und die Co-Kultivierungen mit *C. albicans* wurden 3-5x10<sup>4</sup> Zellen/ml in definierte Wells von klaren und weißen 96-Well MTP eingesät und für 48 h im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37 °C vorinkubiert. Das Zellkulturmedium wurde nach der Vorinkubation entfernt und durch je 100 µl AC-Lösung in verschiedenen Konzentrationen ersetzt. Als Kontrolle dienten in DMEM kultivierte Zellen. 0,1 % Triton-X100 wurde als Referenz für eine



zytotoxische Wirkung verwendet. Die Ansätze wurden für 24 h und 48 h im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Es folgten biochemische Methoden zur Biokompatibilität von AC.

### 2.3.2 Normale humane epidermale Keratinozyten

Normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK) wurden für die Herstellung der Epidermis der 3d-Hautmodelle verwendet. Sie wurden hierfür sieben bis acht Tage in Keratinozyten-Basalmedium (KBM) kultiviert. Die subkonfluenten NHEK wurden zweimal vorsichtig mit warmen PBS gewaschen, nachdem das Zellkulturmedium vollständig entfernt wurde. Danach wurden die Zellen zweimal für je 5 min mit EDTA-PBS im Brutschrank inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Es folgte die Trypsinierung im Brutschrank. Dieser Vorgang wurde nach 2 min mit 10 % FKS in PBS abgestoppt. Die abgelösten NHEK wurden für 5 min bei 1000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands wurden die Zellen in KBM aufgenommen und die Zellzahl wurde bestimmt.

### 2.3.3 Normale humane dermale Fibroblasten

Normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) wurden für die Herstellung der Dermis der 3d-Hautmodelle benötigt. Hierfür wurde das Fibroblasten-Medium nach sieben bis acht Tagen Kultivierung entfernt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit warmen PBS gewaschen, ehe die Zell-Zellverbindungen mit Trypsin bei RT für 2 min bis 3 min gelöst wurden. Die Trypsinierung wurde mit 10 % FKS in PBS abgestoppt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in DMEM mit 10 % FKS und 1 % Gentamycin resuspendiert und die Zellzahl wurde ermittelt.

### 2.3.4 *Candida albicans*

Es wurden zwei unterschiedliche *C. albicans*-Stämme in dieser Arbeit verwendet. Der nicht-invasiv wachsende *C. albicans*-Stamm DSM 1386 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Der invasiv-wachsende *C. albicans*-Stamm ATCC MYA-2876 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Die Stammhaltung beider *C. albicans*-Stämme erfolgte mittels Gefrierkonservierung bei -80 °C. Zur Reaktivierung wurde mit Hilfe einer Impföse je ein Keramik-Kügelchen unter sterilen Bedingungen aus dem Microbank-System entnommen und vorsichtig auf Sabouraud-Dextrose-Agar-Platten (SDA-Platten) ausgerollt. Die beimpften Agarplatten wurden für 24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen gelagert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Versuche wurden unter sterilen Bedingungen Arbeitskulturen hergestellt. Hierzu wurden 20 ml Sabouraud-Glukose-Bouillon in 50-ml-Kulturflaschen mit Kapsenberg-Kappen gefüllt. Mit Hilfe einer

kleinen Impföse wurde das Flüssigmedium mit *Candida*-Kulturen beimpft. Die *Candida*-Kulturen wurden für 24 h bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad kultiviert.

### 2.3.5 Zweidimensionale Co-Kulturmodelle

Als Verknüpfung zwischen der Testung hinsichtlich der antimikrobiellen Wirkung und der Verträglichkeit von AC gegenüber humanen Zellen ist das Co-Kulturmodell zu sehen. Mit Hilfe von Co-Kulturmodellen kann die Wirksamkeit bzw. Verträglichkeit der AC im Zusammenspiel von humanen Zellen und Mikroorganismen *in-vitro* betrachtet werden. In dieser Arbeit kam ein Co-Kulturmodell aus HaCaT-Keratinocyten und *C. albicans* zum Einsatz.

Die Versuchsdurchführung entspricht dem Vorgehen bei HaCaT-Keratinocyten, wie unter Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Jedoch wurden im Fall der Co-Kulturmodelle die HaCaT-Keratinocyten zunächst 1 h mit *C. albicans* ( $1 \times 10^3$  KBE/ml) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor die AC-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen zu den Ansätzen hinzugegeben wurden (Abbildung 2-1).

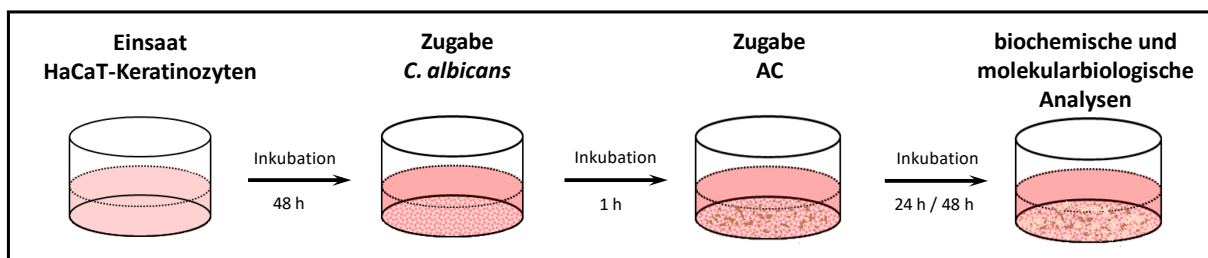


ABBILDUNG 2-1 Schematischer Überblick zum Ansetzen einer 2d-Co-Kultur.

### 2.3.6 Dreidimensionale Co-Kulturmodelle

Um wirklichkeitsnahe Bedingungen darstellen zu können, eignen sich besonders 3d-Zellkultur-Modelle. Diese wurden eigens für die Untersuchungen im Labor hergestellt. Sie bestehen aus einer Dermis mit Fibroblasten in einer Kollagenmatrix und aus Keratinocyten, welche die Epidermis mit einer Hornschicht ausbilden (Abbildung 2-2).

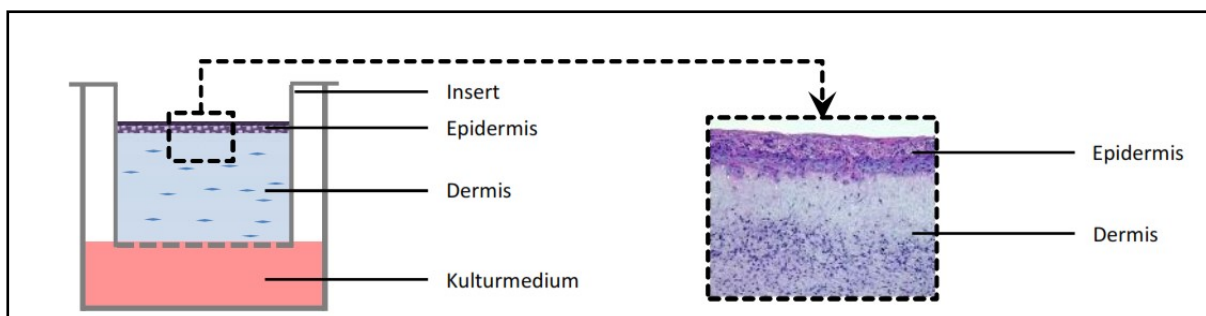


ABBILDUNG 2-2 Schematischer Aufbau eines 3d-Hautmodells.

Zur Herstellung der Dermis wurden frisch passagierte NHDF verwendet (Abbildung 2-3). Die Zellen wurden in Gelneutralisationslösung aufgenommen und mit dem Kollagengemisch vermengt ( $1 \times 10^5$  NHDF pro ml Kollagengemisch). Je 750  $\mu$ l des NHDF-Kollagengemischs wurden zügig und luftblasenfrei in Inserts mit 8  $\mu$ m Porendurchmesser pipettiert. Zur Aushärtung des Kollagens wurde der Ansatz für 15 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Wells von 12-Well MTP mit je 2,1 ml Flutmedium gefüllt. Auf die Inserts wurden je 0,5 ml Flutmedium gegeben. Die vorläufigen Hautmodelle wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Aufgrund der Durchlässigkeit der verwendeten Inserts wurde der Wechsel des Mediums erleichtert.

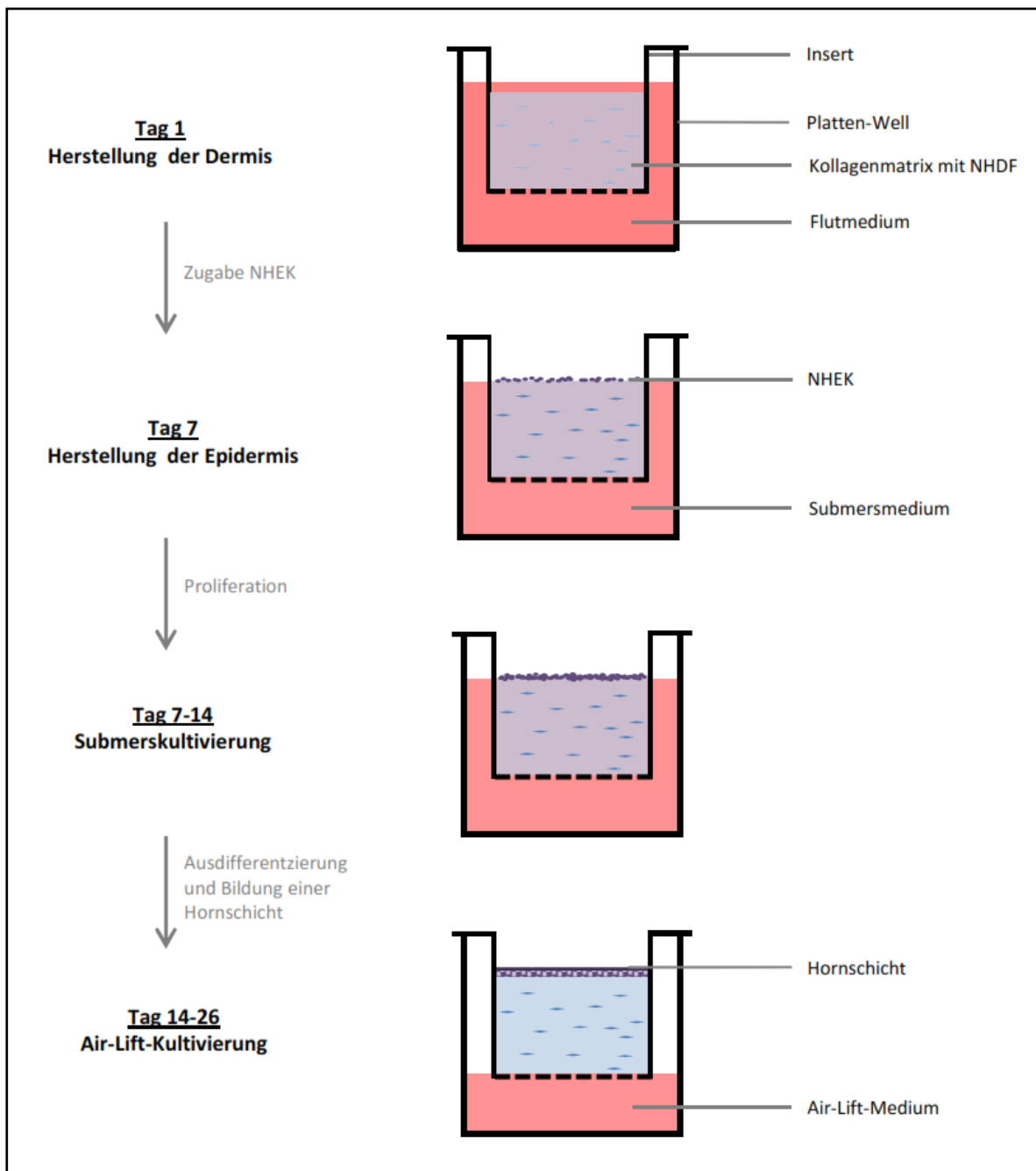


ABBILDUNG 2-3 Schematischer Überblick zur Herstellung eines 3d-Hautmodells.

Nach einer Woche wurde die Epidermis hergestellt. Hierzu wurde zunächst das Flutmedium vollständig aus den Inserts entfernt. Die vorläufigen Hautmodelle wurden mit je 75 µl Fibronektin-Gebrauchslösung beschichtet und für 30 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Währenddessen wurden NHEK frisch passagiert und in KBM aufgenommen ( $6 \times 10^5$  NHEK pro ml KBM). Je 150 µl dieser Zellsuspension wurden direkt auf die Dermis pipettiert und für 45 min im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das restliche Medium entfernt und durch 2,1 ml KBM mit 5 % FKS im Well und durch 0,5 ml auf dem Insert ersetzt. Die weitere Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach 48 h wurde das Medium entfernt und durch KBM mit 2 % FKS und 1 % Gentamycin ersetzt. Nach weiteren zwei Tagen wurde das verbrauchte Medium durch KBM mit 1 % Gentamycin und 1,88 Mm CaCl<sub>2</sub> ausgetauscht. Am 14. Tag wurde mit der Air-Lift-Kultivierung der Hautmodelle begonnen. Hierbei wurden die 3d-Hautmodelle an der Medium-Luft-Grenze kultiviert. Das Medium wurde komplett entfernt und die Inserts mit den Hautmodellen wurden in Thincert-Platten überführt. Die Wells der Thincert-Platten wurden mit soviel Air-Lift-Medium gefüllt, sodass nur die Unterseite der Inserts mit Medium benetzt war. Nun erfolgte der Wechsel des Mediums alle vier bis fünf Tage, bis die 3d-Hautmodelle nach weiteren zwölf Tagen Kultivierung für die anschließenden Versuche verwendet werden konnten.

Die 3d-Hautmodelle wurden zum einen mit dem nicht-invasiv-wachsenden *C. albicans*-Stamm DSM 1386 und zum anderen mit dem invasiv-wachsenden *C. albicans*-Stamm ATCC MYA-2876 infiziert. Dazu wurden zunächst Arbeitskulturen von beiden Hefepilzen, wie unter 2.3.4 beschrieben, hergestellt. Je 1 ml der Übernachtskulturen wurde unter sterilen Bedingungen in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 2 000 min<sup>-1</sup> und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abgenommen und das entstandene Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen. Von beiden gereinigten *Candida*-Kulturen wurde die Ausgangszellzahl am CASY Cell Counter gemessen. Als Inokulum wurde eine Zellzahl von  $1 \times 10^3$  KBE/ml in PBS hergestellt. In der Zwischenzeit wurde das umgebende Medium jedes Hautmodells durch 4 ml frisches Medium ersetzt. Es wurden entweder 10 µl des Inokulums von *C. albicans* DSM 1386 oder 10 µl von *C. albicans* ATCC MYA-2876 mittig auf die Hautmodelle pipettiert. Die infizierten Hautmodelle wurden anschließend für 1 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die infizierten Hautmodelle zusätzlich mit je 10 µl AC-Lösung bzw. PBS als Kontrolle behandelt.

Die Hautmodelle wurden im Anschluss der Inkubation mit den Testlösungen zur Herstellung histologischer Präparate bzw. zur Gewinnung von RNA verwendet. Für die histologische Präparation wurden die Hautmodelle in Einbettkassetten gegeben und bis zur Präparation in 4 %-igem Formalin gelagert. Die Hautmodelle, welche zur Isolation von RNA verwendet werden sollten, wurden in flüssigen Stickstoff gegeben. Die gefrorenen Hautmodelle wurden in Kryoröhrchen überführt und bis zur RNA-Isolation in einem Kryobehälter aufbewahrt.

Das Medium der Air-Lift-Kultivierung wurde zur Bestimmung der Zytotoxizität und für den Nachweis auf Interleukine gesammelt. Das Medium wurde dazu für 5 min bei 4 °C und 200 min<sup>-1</sup> zentrifugiert und der Überstand wurde in Kryoröhrchen überführt und schließlich bei -18 °C gelagert.

## **2.4 Biochemische Methoden zur Bestimmung der Biokompatibilität von AC**

### **2.4.1 Bestimmung des ATP-Gehalts**

Auf Basis der luminometrischen Messung mit Hilfe des ATPLite Assay wurde der Gehalt an ATP der HaCaT-Keratinocyten infolge der Behandlung mit AC bestimmt. Hierfür wurden die Zellen mit den AC-Verdünnungen in weißen MTP inkubiert. Zunächst wurden die Zellkulturüberstände für die Bestimmung der Zytotoxizität und ELISA gesammelt. Daraufhin wurden die Zellen pro Well mit 100 µl frischem Zellkulturmedium und 50 µl Zelllyselösung für 5 min bei 700 min<sup>-1</sup> auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Nach der Zugabe von je 50 µl Substratlösung wurde die MTP zunächst für weitere 5 min schüttelnd und anschließend 10 min ohne Schütteln im Dunkeln inkubiert. Die Messung des Lumineszenzsignals erfolgte im LUMistar Galaxy. Auf Basis einer mitgeführten ATP-Standardkurve wurden die ATP-Konzentrationen ermittelt. Die Zellzahl pro ml wurde mit Hilfe einer ATP-Zellzahl-Standardkurve berechnet.

### **2.4.2 Bestimmung des Gesamt-Proteingehalts**

Der Nachweis des Gesamt-Proteingehalts beruht auf dem Prinzip der Biuretreaktion. Auch in diesem Fall wurden die Zellkulturüberstände nach der Inkubation der Zellen mit AC-Verdünnungen für weitere Analysen gesammelt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS, wurden die Zellen für 15 min mit einer Proteinlyselösung schüttelnd inkubiert. Die Proteine wurden für 15 min in einem 90 °C heißen Wasserbad denaturiert. Die abgekühlten MTP mit den Proteinlysaten wurden bei -20 °C eingefroren. Nach frühestens 24 h wurde der Gesamt-Proteingehalt unter Verwendung des Pierce BCA Protein Assay quantifiziert. Zu den aufgetauten Lysaten wurden je 200 µl BCA-Reagenz gegeben und für 30 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Die OD wurde bei 580 nm im FLUOstar Galaxy gemessen. Anhand einer BSA-Standardkurve wurde die Proteinkonzentration ermittelt. Die Zellzahl pro ml wurde mit Hilfe einer Protein-Zellzahl-Standardkurve berechnet.

### **2.4.3 Bestimmung der Zytotoxizität**

Der Nachweis auf Zytotoxizität erfolgte bei den 2d- und 3d-Modellen mit Hilfe eines Cytotoxicity Detection Kit auf Grundlage des Enzyms Lacatdehydrogenase (LDH). In eine klare 96-Well MTP wurden pro Well je 50 µl der gesammelten Zellkulturüberstände in Doppelbestimmung pipettiert. Als Blindwert wurde je 100 µl frisches KBM bzw. Air-Lift-Medium in Doppelbestimmung in die Platte pipettiert. Pro bestücktem Well wurden 50 µl des gelösten LDH-Substrats zügig dazu gegeben. Die

Platte wurde für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Stopplösung pro Well beendet. Nachdem die Platte kurz geschüttelt wurde, erfolgte die Absorptions-Messung im POLARstar Galaxy bei 490 nm und 620 nm. Die Zytotoxizität wurde im Vergleich zu einer Positiv-Kontrolle (1 % Triton-X 100) ermittelt.

#### 2.4.4 Quantitative Bestimmung von Interleukinen

Die quantitative Bestimmung der Interleukine IL-6, IL-1 $\alpha$  und IL-8 erfolgte mit spezifischen Enzymimmunoassays (ELISA). Zu Beginn dieser ELISA wurden hochbindende MTP mit den spezifischen Antikörpern beschichtet und über Nacht bei RT (für IL-1 $\alpha$  und IL-8) bzw. bei 4 °C (für IL-6) inkubiert. Die weiteren Vorgehensweisen der jeweiligen Interleukin-Bestimmungen sind Tabelle 2-9 zu entnehmen.

**TABELLE 2-9** Übersicht über die Durchführung der ELISA zur quantitativen Bestimmung der Interleukine IL-6, IL-1 $\alpha$  und IL-8.

	IL-6	IL-1 $\alpha$	IL-8
Waschen	2x 200 $\mu$ l PBS	3x 400 $\mu$ l Waschpuffer	
Blockieren	200 $\mu$ l 1 % BSA in PBS	300 $\mu$ l 1 % BSA in PBS	
Inkubation	1 h bei RT		
Waschen	3x 300 $\mu$ l Waschpuffer	3x 400 $\mu$ l Waschpuffer	
Zugabe	100 $\mu$ l Zellkulturüberstand bzw. Standard		
Inkubation	2 h bei RT		
Waschen	5x 300 $\mu$ l Waschpuffer	3x 400 $\mu$ l Waschpuffer	
Zugabe	100 $\mu$ l spezifische Antikörperlösung		
Inkubation	1 h bei RT	2 h bei RT	
Waschen	5x 300 $\mu$ l Waschpuffer	3x 400 $\mu$ l Waschpuffer	
Zugabe	100 $\mu$ l Streptavidin-konjugierte Peroxidase		
Inkubation	1 h bei RT	20 min bei RT	
Waschen	5x 300 $\mu$ l Waschpuffer	3x 400 $\mu$ l Waschpuffer	
Zugabe	100 $\mu$ l TMB-Substrat-Lösung		
Inkubation	20 min im Dunkeln		
Zugabe	100 $\mu$ l Stopplösung	50 $\mu$ l Stopplösung	100 $\mu$ l Stopplösung

Die Messung der OD erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm im FLUOstar Galaxy mit einer Referenzwellenlängenmessung bei 620 nm. Die quantitative Auswertung erfolgt anhand einer Standardkurve.

## 2.5 Methoden zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung von AC

Die antimikrobielle Wirkung der AC wurde gegenüber dem Hefepilze *C. albicans* auf Grundlage von Wachstumsuntersuchungen und der luminometrischen Bestimmung des mikrobiellen ATP-Gehalts untersucht.

### 2.5.1 Wachstumsuntersuchung von *C. albicans*

Die Wirkung der AC auf die beiden *C. albicans*-Stämme DSM 1386 und ATCC MYA-2876 wurde über einen Zeitraum von 24 h in einem MTP-Lasernephelometer beobachtet und dokumentiert. Für die Wachstumsuntersuchungen wurden 24 h-Arbeitskulturen der Hefepilze verwendet. Von diesen wurden Inokula von  $6-8 \times 10^3$  KBE/ml unter Verwendung des CASY Cell Counter eingestellt.

Unter sterilen Bedingungen wurden die MTP für den Nephelometrie-Versuch bestückt. In die Wells einer 96-Well MTP wurden für die Wachstumskontrolle je 100 µl Flüssigmedium vorgelegt. Von den jeweiligen AC wurden Verdünnungen in Flüssigmedium hergestellt. Je 100 µl der AC-Verdünnungen wurden in die vorgegebenen Wells pipettiert. *C. albicans* wurde zusätzlich mit 0,05 % Chlorhexidindigluconat (CHX) inkubiert, um einen negativen Einfluss auf das mikrobielle Wachstum darstellen zu können.

Zu jedem Well wurden je 100 µl Inokulum hinzu pipettiert. Als Blindwerte wurden für die Wachstumskontrollen 200 µl Flüssigmedium gewählt. Für die Blindwerte der unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen wurden zu je 100 µl Flüssigmedium 100 µl der entsprechenden Testkonzentration gegeben. Als Schutz vor Verdunstung wurden die MTP mit einer durchsichtigen Folie verschlossen. Damit ein Gasaustausch stattfinden konnte, wurden unter Verwendung von sterilen Kanülen Löcher in die Folien gestochen.

Mit einer Laserintensität von 1 % und einer Laserstrahlfokussierung von 2,5 mm wurden die Wachstumskurven im NEPHELOstar Galaxy aufgezeichnet. Vor jeder Messung, die stündlich erfolgte, wurden die Platten für 60 s bei  $300 \text{ min}^{-1}$  geschüttelt. Die MTP wurden über den gesamten Zeitraum von 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Messwerte der Trübung wurden vom Messgerät als Relative Nephelometereinheiten (RNU) ausgegeben. Aus Wells ohne sichtbares mikrobielles Wachstum wurden jeweils 100 µl auf SDA-Platten ausplattiert, im Brutschrank entsprechend der Kultivierungsbedingungen inkubiert und anschließend ausgewertet.

### 2.5.2 Bestimmung des mikrobiellen ATP-Gehalts

Im Anschluss an die Wachstumsuntersuchung wurde der mikrobielle ATP-Gehalt luminometrisch mit Hilfe des BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay bestimmt. Dazu wurden die MTP zunächst bei RT auf einem Orbitalschüttler geschüttelt. Zwischenzeitlich wurde das Substrat mit dem Puffer gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden in eine weiße MTP 90 µl Flüssigmedium pro Well vorgelegt. Je 10 µl der Candida-Suspension wurden überführt und mit

100 µl der lysierten Reagenz für 15 min auf einem Orbitalschüttler bei 300 min<sup>-1</sup> abgedeckt inkubiert. Anschließend wurde die Messung der Lumineszenz im PHERAstar Galaxy durchgeführt. Die Messwerte wurden vom Luminometer als Relative Lichteinheiten (RLU) ausgegeben. Auf Basis einer ATP-Standardkurve wurden die ATP-Konzentrationen ermittelt.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Isolation von gDNA und Quantifizierung von *C. albicans* in 2d-Co-Kulturmodellen

Nach der Co-Kultivierung von HaCaT-Keratinocyten und *C. albicans* und Behandlung mit AC (siehe 2.3.5) wurde die gDNA der mikrobiellen Zellen mit einem Quick-gDNA Kit der Firma Zymo Research isoliert.

Vor Beginn der Isolation wurden die MTP mit den co-kultivierten Zellen für 3 min bei 1000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert und die Überstände wurden entfernt. Die Lyse der Hefezellen erfolgte über Nacht bei 56 °C und 200 min<sup>-1</sup> in einer Proteinase K-Lösung (4 mg/ml). Am folgenden Tag wurden zu den Zelllysaten die vierfache Menge an Genomic Lysis Buffer hinzu gegeben, durch Schütteln vermischt und für 5 min bei 12000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Zum Schutz vor β-Mercaptoethanoldämpfen wurden dieser und alle nachfolgenden Schritte unter einem Abzug durchgeführt. Je 600 µl des Überstands wurden in eine Silicon-A Plate überführt und bei 10000 min<sup>-1</sup> für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl DNA Pre-Wash Buffer zu jeden Well gegeben und für 5 min zentrifugiert. Danach wurde dieser Schritt mit 300 µl gDNA Wash Buffer wiederholt.

Die Elution der gDNA erfolgte in DNA Elution Buffer. Dazu wurden die Proben für maximal 5 min in diesem Puffer inkubiert und anschließend für 5 min bei 10000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert.

Zur Überprüfung der Reinheit der gDNA wurde die OD bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Ein Wert von 1,8 des Verhältnisses von OD<sub>260 nm</sub> zu OD<sub>280 nm</sub> entspricht einer reinen DNA. Die gDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Die Anzahl mikrobieller Zellen im Co-Kulturmodell wurde über die gDNA bestimmt. Hierbei erfolgte die Quantifizierung mittels quantitativer PCR (qPCR) auf Grundlage eines zellspezifischen Primerpaars. Dieses Primerpaar weist eine Kompatibilität zur Internal Transcribed Spacer (ITS) 1 und 2 Sequenz auf.

In PCR-Reaktionsgefäßen wurden je 1 µl gDNA mit 19 µl des SYBR-Green-Mastermix (Tabelle 2-10, links) vermischt. Die Quantifizierung erfolgte im Rotor-Gene-Q nach einem *C. albicans*-spezifischen Programm (Tabelle 2-10, rechts) und Mitführen eines Standards.



**TABELLE 2-10** Zusammensetzung des Master-Mix (pro gDNA-Probe; links) zur Quantifizierung von *C. albicans* im Co-Kulturmodell und Übersicht über die qPCR Programmabläufe im Rotor-Gene-Q zur Quantifizierung von *C. albicans* (rechts).

Zusammensetzung		Programm für <i>C. albicans</i>		
Master-Mix		Zyklus	Temperatur	Zeit
10 µl	SYBR-Green	1	95 °C	180 s
1 µl	forward Primer	2 – 39	95 °C	5 s
1 µl	reverse Primer		63,5 °C	15 s
7 µl	DNase-freies Wasser		72 °C	5 s
		40	65 – 95 °C	–

### 2.6.2 Isolation von RNA aus 3d-Hautmodellen und Untersuchung der relativen Expression von Entzündungsmarkern und antimikrobiellen Peptiden

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden neben den üblichen Vorgehensweisen zusätzlich mit Mundschutz durchgeführt. Die Arbeitsmaterialien und -flächen wurden mit RNase-away behandelt.

Zur RNA-Isolation wurden die aufbewahrten 3d-Hautmodelle einzeln in RNase-freie Reaktionsgefäße mit je 500 µl RL-Lyselösung und drei Stahlkugeln gegeben. Die Hautmodelle wurden in einer Kugelmühle für 30 sec und 30 Hz homogenisiert. Dies erfolgte viermal hintereinander, wobei nach dem zweiten Mal die Reaktionsgefäße mit den Hautmodellen kurz auf Eis abgekühlt wurden. Anschließend wurden die homogenisierten Hautmodelle für 1 min bei 14000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert und auf Eis gelagert. Je 400 µl des Lysats wurden auf eine Vorsäule des innuPrep RNA Mini Kit gegeben und für 2 min bei 12000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Zu dem Filtrat wurden 400 µl 70 % Ethanol gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Das Gemisch wurde auf eine frische Filtersäule gegeben und für 2 min bei 12000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl der Waschlösung HS auf die Filtersäule gegeben. Nach Zentrifugation bei 12000 min<sup>-1</sup> für 1 min wurden 750 µl der Waschlösung LS zugegeben und erneut für 1 min bei 12000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Um Ethanolreste zu entfernen, wurde der Ansatz erneut für 2 min bei 12000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Die isolierte RNA wurde in 80 µl RNase-freiem Wasser eluiert, für 1 min bei RT inkubiert und nach Zentrifugation bei 8000 min<sup>-1</sup> für 1 min bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die isolierten RNA der 3d-Hautmodelle wurden in RNase-freien Reaktionsgefäßen zusammen mit DNase und Reaktionspuffer für 30 min bei 37 °C in einem Thermocycler inkubiert, um Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurden je 2 µl EDTA zugegeben und für 10 min bei 65 °C in einem Thermocycler inkubiert. Die Reinheit der RNA wurde anhand des Verhältnisses der

OD von 260 nm zu 280 nm ermittelt (ein Wert von 2,0 entspricht einer reinen RNA). Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die RNA-Proben bei -80 °C gelagert.

Die reinen RNA-Proben wurden mittels High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit in einer enzymatischen Reaktion in cDNA umgeschrieben. Auf Eis wurden jeweils 20 µl Master-Mix (Tabelle 2-11, links) und 20 µl RNA in Reaktionsgefäßen vermischte. Das Programm, mit dem die Proben im Thermocycler inkubiert wurden, ist Tabelle 2-11 (rechts) zu entnehmen. Anschließend wurden die cDNA-Proben bis zur qPCR bei -80 °C gelagert.

**TABELLE 2-11** Zusammensetzung des Master-Mix (pro RNA-Probe) für die Reverse-Transkriptase-Reaktion (links) und Thermocycler-Protokoll (rechts).

Zusammensetzung		Umschreibung in cDNA		
Master-Mix		Zyklus	Temperatur	Zeit
5 µl	RT-Puffer	1	25 °C	10 s
2 µl	dNTP-Mix	2	37 °C	120 min
5 µl	RT random Primer	3	85 °C	5 min
2,5 µl	RNase-Inhibitor	4	4 °C	∞
8 µl	Nuklease-freies Wasser			

Neben der quantitativen Bestimmung der Interleukine IL-6, IL-1 $\alpha$  und IL-8 mittels ELISA wurde die relative Expression der Entzündungsmediatoren IL-6, IL-8, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-18, sowie den antimikrobiellen Peptiden hBD-3 und LL-37 mittels RT-qPCR analysiert. Für diese Analyse wurde das Referenzgen  $\beta$ -Aktin verwendet. Zu je 17 µl Master-Mix (Zusammensetzung siehe Tabelle 2-12, links) wurden 3 µl cDNA gegeben. Im Rotor-GeneQ wurde folgendes Programm durchlaufen (Tabelle 2-12, rechts).

**TABELLE 2-12** Zusammensetzung des Master-Mix (links) und Übersicht über den RT-qPCR Programmablauf im Rotor-Gene-Q für die relative Expression von Entzündungsmediatoren und antimikrobiellen Peptiden (rechts).

Zusammensetzung		Programm relative Expression		
Master-Mix		Zyklus	Temperatur	Zeit
10 µl	SYBR-Green	1	95 °C	120 s
1 µl	forward Primer	2–40	95 °C	2 s
1 µl	reverse Primer		60–65 °C	10 s
5 µl	RNase-freies Wasser		72 °C	5–20 s

Die Effizienz der RT-qPCR wurde nach der Methode von Pfaffl<sup>89</sup> für jedes verwendete Primärpaar überprüft.

## 2.7 Histologische Präparation von 3d-Co-Kulturmodellen

Die zur histologischen Präparation in Formalin aufbewahrten Hautmodelle wurden in einer Histokinette in aufsteigender Alkoholreihe bei 40 °C inkubiert. Nachdem die Hautmodelle dreimal mit 40 °C warmem Xylol behandelt wurden, wurden sie in 60 °C warmes Paraffin überführt. Am nächsten Tag wurden die Hautmodelle mit 60 °C warmen Paraffin in Blöcke gegossen und ausgehärtet. Die eingebetteten Hautmodelle wurden bis zum Schneiden bei -15 °C gelagert.

An einem Mikrotom wurden Schnitte von ca. 4 µm Dicke angefertigt und in ein 40 °C warmes Wasserbad überführt. Die Schnitte wurden glatt auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgezogen und zunächst bei 45 °C auf einer Heizplatte und anschließend in einem Wärmeschrank bei 60 °C für 35 min getrocknet. Nachdem das Paraffin mit einer absteigenden Alkoholreihe aus den Schnitten entfernt wurde, erfolgten die Periodsäure-Schiff'sche (PAS) Färbung (Tabelle 2-13, links) bzw. die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE; Tabelle 2-13, rechts) der Schnitte in einem automatisierten IHC-Färbeautomat.

**TABELLE 2-13** Übersicht über den Ablauf der automatisierten Färbung der 3d-Co-Kulturmodelle mit Periodsäure und Schiff'scher Reagenz (links) bzw. mit Hämatoxylin-Eosin (rechts).

Periodsäure-Schiff'sche Färbung		Hämatoxylin-Eosin-Färbung	
Reagenz	Inkubationszeit	Reagenz	Inkubationszeit
Aqua dest.	<i>Spülen</i>	Xylol	10 min und 5 min
Periodsäure	5 min	Alkohol, absolut	1 min und 3 min
Leitungswasser	3 min	Alkohol, 96 %	3 min und 3 min
Aqua dest.	<i>Spülen</i>	Alkohol, 70 %	3 min
SCHIFFs Reagenz	15 min	Alkohol, 50 %	3 min
Leitungswasser	3 min	Aqua dest.	3 min
Aqua dest.	<i>Spülen</i>	Hämatoxylin	4 min
Hämatoxylin	2 min	Leitungswasser	10 min
Leitungswasser	3 min	Aqua dest.	3 min und 3 min
Alkohol, 50 %	<i>Spülen</i>	Eosin	2 min
Alkohol, 70 %	<i>Spülen</i>	Leitungswasser	5 min
Alkohol, 70 %	<i>Spülen</i>	Aqua dest.	3 min und 5 min
Alkohol, absolut	<i>Spülen</i>	Alkohol, 50 %	3 min
Xylol	<i>Spülen</i>	Alkohol, 70 %	3 min
		Alkohol, 70 %	5 min
		Alkohol, absolut	3 min und 3 min
		Xylol	2 min und 5 min

## 2.8 Mikroskopische Analysen

### 2.8.1 Fluoreszenzmikroskopie

Zur optischen Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurden HaCaT-Keratinocyten nach der Behandlung mit AC mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 13 und Ethidiumhomodimer-2 (EthD-2) angefärbt.

Hierzu wurden die humanen Zellen mit einer Zelldichte von  $1,4-2,8 \times 10^4$  Zellen/Well in 8-Well-Objektträger eingesät. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit verschiedenen AC-Konzentrationen behandelt und nach weiteren 24 h erfolgte die Färbung mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen. Zur Vorbereitung der Färbung wurden die HaCaT-Keratinocyten zweimal mit HBSS-Puffer gewaschen und anschließend für 15 min mit der Färbelösung (HBSS-Puffer mit 10 nM SYTO 13 und 2 nM EthD-2) im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Färbelösung entfernt wurde, wurden die Zellen einmal mit HBSS-Puffer gewaschen. Der Rahmen des 8-Well-Objektträgers wurde entfernt und der Objektträger wurde mit einem Deckgläschen eingedeckelt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten am Fluoreszenzmikroskop entsprechend der Anregungswellenlängen der Farbstoffe (SYTO 13: Extinktion bei 488 nm und Emission bei 509 nm; EthD-2: Extinktion bei 535 nm und Emission bei 624 nm).

Zur optischen Beurteilung der Wirkung von AC auf den Hefepilz *C. albicans* wurde dieser für 24 h mit einer fluoreszierenden AC mit EDA als funktioneller Gruppe unter entsprechenden Kulturvierungsbedingungen inkubiert. Anschließend wurden Proben auf Objektträger aufgebracht und mit Deckgläschen eingedeckelt. Entsprechend der Anregungswellenlängen der fluoreszierenden AC (Extinktion bei 331 nm und Emission bei 550 nm) wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

### 2.8.2 Durchlichtmikroskopie

Nach der histologischen Präparation und PAS- bzw. HE-Färbung der unbehandelten und behandelten 3d-Hautmodelle wurden die Präparate bei verschiedenen Vergrößerungen am Mikroskop ausgewertet und fotografiert.

### 2.8.3 Rasterelektronenmikroskopie

Von den unbehandelten und mit AC-behandelten *C. albicans*-Zellsuspensionen wurden je 1 ml in sterile Reaktionsgefäße abgefüllt und für 5 min bei  $2500 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert. Reste von Kulturmedium wurden durch Spülen mit PBS entfernt. Hierzu wurden die Zellsuspensionen schonend für 5 min bei  $2500 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden erneut in frischem PBS schonend zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Hefezellen in Glutaraldehyd (2,5 % in

PBS) für 60 min bei RT. Anschließend wurden die fixierten Hefezellen dreimal mit Cacodylatpuffer gewaschen und in Cacodylatpuffer aufbewahrt. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden durch Mitarbeiter des Elektronenmikroskopischen Zentrums in Jena durchgeführt. Nachdem die fixierten Hefezellen mit Wasser gespült wurden, erfolgte die Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe. Im Anschluss erfolgte die Trocknung der Präparate mittels Kritischer-Punkt-Trocknung. Die Präparate wurden mit einer 2 nm dicken Platinschicht überzogen. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten an einem Zeiss LEO 1450 VP Elektronenmikroskop bei 8 kV.

#### 2.8.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde ebenfalls *C. albicans* mit AC behandelt. Die weitere Durchführung ist unter dem Abschnitt 2.8.3 beschrieben. Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden durch Mitarbeiter des Elektronenmikroskopischen Zentrums in Jena durchgeführt. Die Ultradünnschnitte wurden mit einer 3 nm dicken Platinschicht überzogen. Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten an einem Zeiss-CEM 902A Elektronenmikroskop bei 80 kV.

### 2.9 Statistische Analyse

Alle Versuche wurden mindestens in zwei voneinander unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Die einzelnen Messungen erfolgten dabei mindestens in Dreifachbestimmung. Die Werte werden im Folgenden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Zur statistischen Auswertung der Werte wurde ein ungepaarter t-Test mittels Microsoft® Excel 2007 durchgeführt.

Statistisch signifikante Werte werden in den Diagrammen durch Sternsymbolik gekennzeichnet, wobei für  $p$ -Werte  $\leq 0,001$  „\*\*\*“, für  $p \leq 0,01$  „\*\*“ und für  $p \leq 0,05$  „\*“ angegeben werden.

Die Berechnungen der  $LC_{50}$ - und  $IC_{50}$ -Werte erfolgte unter Verwendung von Origin® 7.0SRO, OriginLab.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Untersuchung der AC auf Endotoxine

Da es sich bei den AC um wässrige Lösungen handelt, welche im chemischen Labormaßstab hergestellt worden sind, wurden diese zunächst auf eine mögliche Verunreinigung mit Endotoxinen untersucht. Bakterielle Endotoxine können toxische Wirkungen hervorrufen und somit die Ergebnisse hinsichtlich Zellverträglichkeit und antimikrobielle Wirkung negativ beeinflussen.

Der verwendete Test dient zum Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Bakterien. Bei diesen sind die potentiell toxischen Lipopolysaccharide (LPS), die sogenannten Endotoxine, auf der äußeren Membran der Zellwand zu finden. Infolge einer Lyse der Bakterien werden Endotoxine in großen Mengen freigesetzt und in die Umgebung abgegeben.

Mit dem angewandten Test können Endotoxine über ein LPS-bindendes Protein des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* nachgewiesen werden. In einer enzymatischen Reaktion wirkt vorhandenes Endotoxin als Katalysator und es kommt zu einer Gelbfärbung der Reaktionslösung. Je höher der Endotoxingehalt ist, desto schneller findet die Reaktion statt. Die Reaktion wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm aufgenommen und anhand einer mitgeführten Standardkurve kann die Endotoxinkonzentration einer Probe bestimmt werden. Mit der Standardkurve wird ein Messbereich von 0,005 EU/ml bis 50 EU/ml erfasst.

Um ein gültiges Testergebnis zu erzielen, wurden die jeweiligen AC-Verdünnungen mit 0,5 EU/ml als PPC versetzt.

Anhand der gemessenen Endotoxinstandards lässt sich eine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit im LAL-Test vom Endotoxingehalt bestätigen. Die Reaktionszeit der aktivierten Enzyme steigt proportional zum Endotoxingehalt an. So findet die Gelbfärbung der Reaktionslösung mit 50 EU/ml nach 9 min statt, während bei dem niedrigsten Endotoxingehalt (0,0005 EU/ml) die Gelbfärbung der Lösung erst nach 72 min photometrisch messbar ist (Tabelle 3-1).

**TABELLE 3-1** Reaktionszeit der Endotoxinstandards im LAL-Test. Je höher der Endotoxingehalt ist, desto schneller findet die enzymatische Reaktion statt.

Standard in EU/ml	0	0,0005	0,005	0,5	5	50
Reaktionszeit in min	-	72	40	22	14	9

Bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Untersuchungsmethode befinden sich die Wiederfindungsraten der PPC bei den Verdünnungsstufen 1:100 und 1:1000 nicht im erforderlichen Bereich von 50 % bis 200 % (0,25 EU/ml bis 1 EU/ml) und die Ergebnisse sind dementsprechend ungültig. Erst bei einer Verdünnung der AC-Proben von 1:10000 liegt die Wiederfindungsrate der mitgeführten PPC im Bereich von 0,5 EU/ml, wie Tabelle 3-2 zu entnehmen ist.

**TABELLE 3-2** Zur Kontrolle des LAL-Testverfahrens wurden AC-Verdünnungen mit je 0,5 EU/ml als positive Produktkontrolle (PPC) versetzt. Befindet sich die Wiederfindungsrate der PPC im Bereich von 50 % (0,25 EU/ml) bis 200 % (1 EU/ml), so handelt es sich um ein gültiges Testergebnis (fett markiert).

Probe mit 0,5 EU/ml PPC	Verdünnungsstufe der Probe	Wiederfindungsrate in %	Endotoxingehalt in EU/ml
AC-EDA <sub>0,45</sub>	1:100	26	0,132
	1:1000	43	0,217
	<b>1:10000</b>	<b>90</b>	<b>0,450</b>
AC-EDA <sub>0,55</sub>	1:100	-	-
	1:1000	23	0,117
	<b>1:10000</b>	<b>100</b>	<b>0,502</b>
AC-TAEA <sub>0,35</sub>	1:100	-	-
	1:1000	14	0,071
	<b>1:10000</b>	<b>96</b>	<b>0,479</b>
AC- TAEA <sub>0,56</sub>	1:100	-	-
	1:1000	5	0,0248
	<b>1:10000</b>	<b>92</b>	<b>0,458</b>

Bei den 1:10000 verdünnten AC-Lösungen, welche nicht mit PPC versetzt wurden, ist keine Gelbfärbung der Reaktionslösungen photometrisch messbar (Tabelle 3-3). Für AC-Verdünnungen, welche zur Überprüfung des Endotoxinnachweistests mit PPC versetzt worden sind, zeigen sich entsprechend des Endotoxinstandards von 0,5 EU/ml nach 22 min bzw. 23 min Gelbfärbungen der Lösungen (Tabelle 3-3).

Zusammenfassend können mit dem LAL-Test Verunreinigungen der AC-Lösungen mit Endotoxinen ausgeschlossen werden.

**TABELLE 3-3** Reaktionszeit der jeweiligen AC-Lösungen (1:10000 verdünnt) mit und ohne positive Produktprobe (PPC; 0,5 EU/ml).

Probe	AC-EDA <sub>0,45</sub>		AC-EDA <sub>0,55</sub>		AC-TAEA <sub>0,35</sub>		AC- TAEA <sub>0,56</sub>	
	ohne PPC	mit PPC	ohne PPC	mit PPC	ohne PPC	mit PPC	ohne PPC	mit PPC
Reaktionszeit in min	-	23	-	22	-	22	-	23

## 3.2 Untersuchung der AC auf Mutagenität

Um eine mutagene Wirkung der AC im Vorfeld ausschließen zu können, wurden diese mit einem Ames-Test untersucht. Infolge einer mutagenen Wirkung können durch verschiedene Mutationen irreversible Schäden in der DNA entstehen. Der angewendete Test berücksichtigt die genetisch veränderten Bakterienstämme *S. typhimurium* TA 98 und TA 100, welche aufgrund von minimalen DNA-Sequenzänderungen nicht in der Lage sind, in histidinfreiem Flüssigmedium zu wachsen. Bei

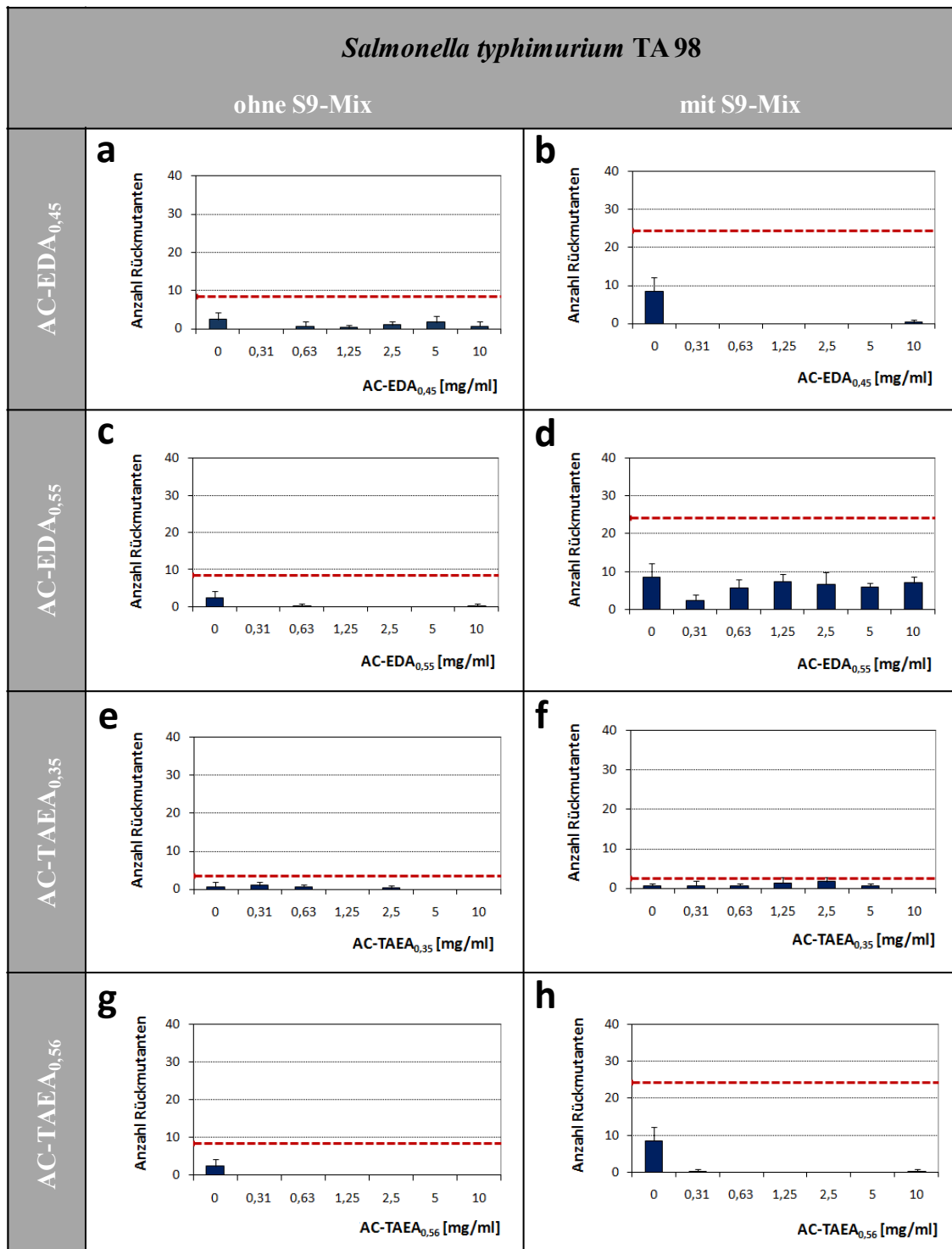
dem Bakterienstamm TA 98 fehlt in der genomischen Sequenz eine Base. Während bei dem Stamm mit der Bezeichnung TA 100 eine Base durch eine andere ausgetauscht wurde.

Durch mutagene Substanzen können bei den Bakterienstämmen Rückmutationen ausgelöst werden, die es den Bakterien wieder ermöglichen Histidin selbst zu erzeugen, um somit im histidinfreien Flüssigmedium zu wachsen. Da aufgrund der minimalen Sequenzänderungen auch spontan Rückmutationen auftreten können, wurden zur Ermittlung der Spontan-Mutationsrate Kontrollen verwendet, denen keine AC zugesetzt wurden. Durch Zugabe eines Rattenleberextrakts, dem sogenannten S9-Mix, können mit dem Ames-Test Substanzen erfasst werden, die erst nach einer metabolischen Aktivierung ihre mutagene Wirkung auf den Organismus entfalten können.

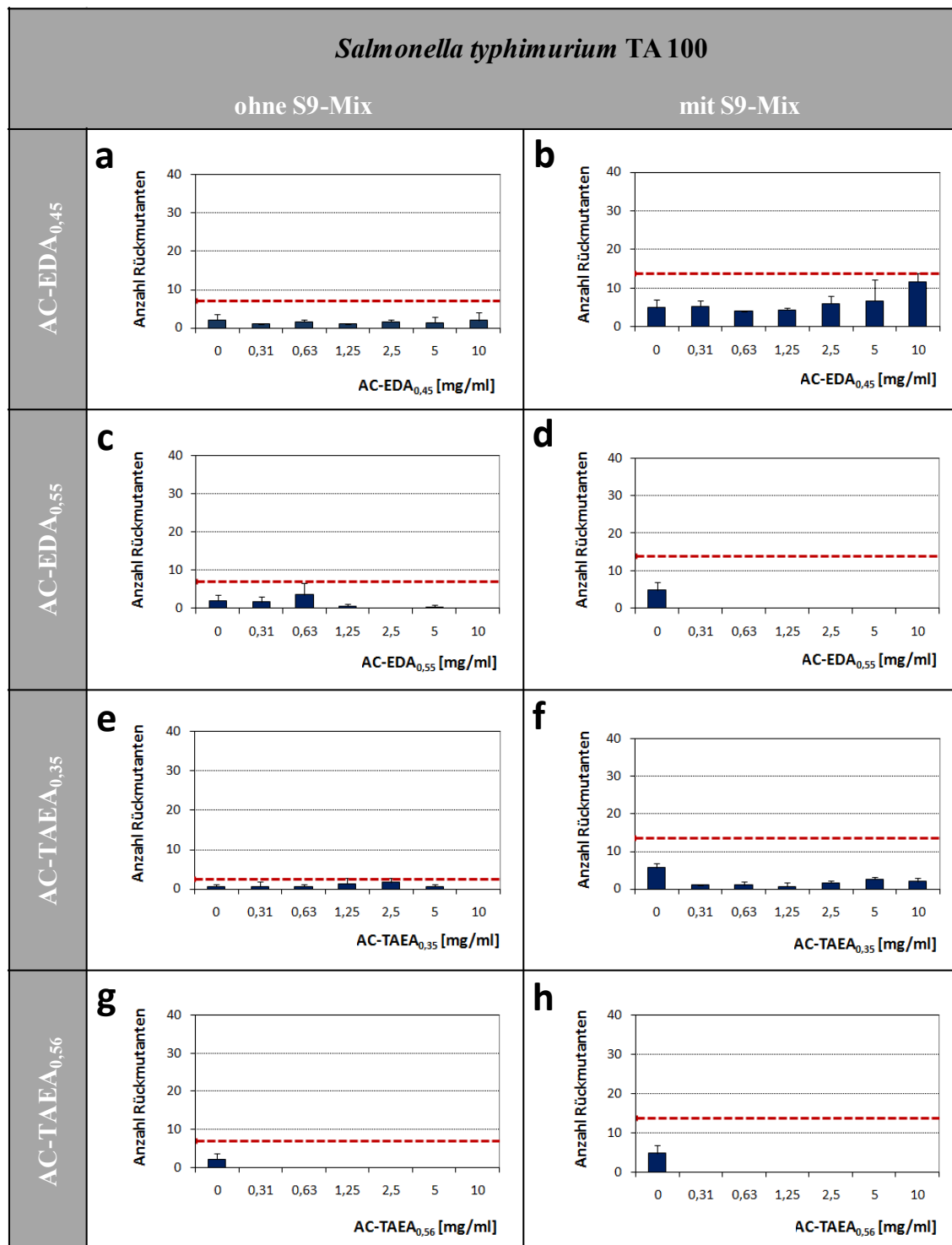
Im Allgemeinen zeigen die Ergebnisse des Ames-Tests, dass es bei den Kontrollen gelegentlich zu spontanen Mutationen (Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2) kommt, wodurch beide Bakterienstämme wieder die Fähigkeit erlangen, sich im histidinfreien Medium zu vermehren. Diese Beobachtung wird von dem verwendeten Test berücksichtigt. In Abhängigkeit von der Kontrolle wird der Grenzwert (rote gestrichelte Linie in den Diagrammen) gesetzt. Oberhalb dieser Grenze geht man von einer mutagenen Wirkung aus. Beim Betrachten der Diagramme fällt auf, dass dieser Grenzwert im Vergleich der einzelnen Tests untereinander variiert.

Hinsichtlich des Tests mit dem Bakterienstamm TA 98 kann für die getesteten AC unabhängig von der Inkubation ohne bzw. mit S9-Mix keine Mutagenität nachgewiesen werden (Abbildung 3-1). Zu diesem Ergebnis kommt auch die Untersuchungen mit dem Bakterienstamm TA 100 (Abbildung 3-2).





**ABBILDUNG 3-1** Ergebnisse der Mutagenitätsuntersuchung. Die AC wurden unter Verwendung des Bakterienstamms *S. typhimurium* TA98 auf eine potentielle mutagene Wirkung untersucht. Hierbei wurde ohne (links) bzw. mit S9-Mix (rechts) getestet. Alle AC (AC-EDA<sub>0,45</sub>: a und b; AC-EDA<sub>0,55</sub>: c und d; AC-TAEA<sub>0,35</sub>: e und f; AC-TAEA<sub>0,56</sub>: g und h) zeigen in diesem Test keine mutagene Wirkung.



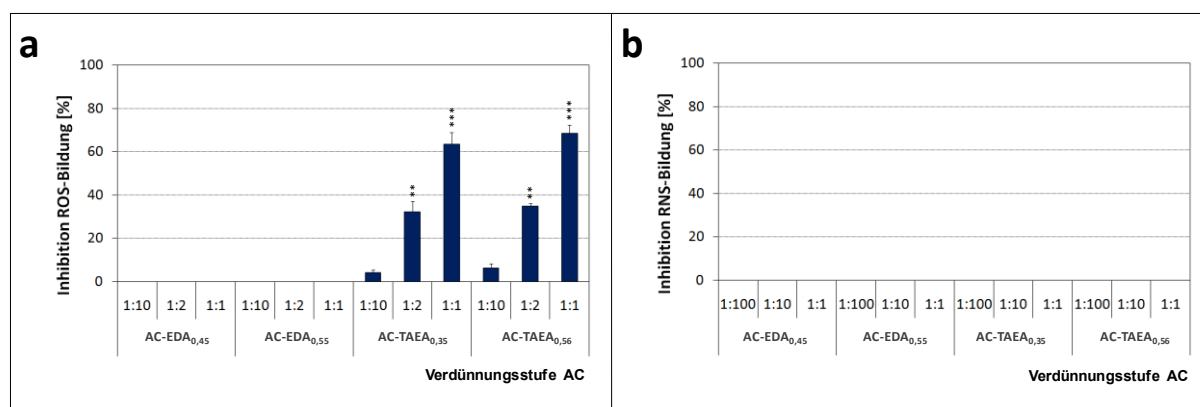
**ABBILDUNG 3-2** Ergebnisse der Mutagenitätsuntersuchung. Die AC wurden unter Verwendung des Bakterienstamms *S. typhimurium* TA100 auf eine potentielle mutagene Wirkung untersucht. Hierbei wurde ohne (links) bzw. mit S9-Mix (rechts) getestet. Alle AC (AC-EDA<sub>0,45</sub>: a und b; AC-EDA<sub>0,55</sub>: c und d; AC-TAEA<sub>0,35</sub>: e und f; AC-TAEA<sub>0,56</sub>: g und h) zeigen in diesem Test keine mutagene Wirkung.

### 3.3 Antioxidative Wirkung der AC gegenüber ROS und RNS

Die Fähigkeit von AC freie Radikale wie ROS und RNS zu inhibieren wurde mit einem Chemilumineszenz-Assay auf Grundlage von Pholasin analysiert. Pholasin ist ein Photoprotein der Dattelmuschel *Pholas dactylus*. Bei den Untersuchungen hinsichtlich der antioxidativen Wirkung wird die Fähigkeit von Pholasin Licht infolge einer Oxidation zu emittieren genutzt. Im Fall von ROS wird die Inhibierung der Oxidation von Pholasin durch freie Sauerstoffradikale berücksichtigt, während bei der Untersuchung hinsichtlich RNS die Wirksamkeit eines Antioxidans, die Oxidation von Pholasin durch Peroxynitrit zu hemmen, erfasst wird.

AC mit TAEA-Funktionalisierung sind in der Lage ROS zu binden und antioxidativ wirksam. AC-TAEA<sub>0,56</sub> zeigt ein minimal größeres Potential die ROS-Bildung zu hemmen, als AC-TAEA<sub>0,35</sub> (Abbildung 3-3 a). Mit einer unverdünnten Lösung von AC-TAEA<sub>0,56</sub> werden 69 % der gebildeten ROS gehemmt. Bei AC-TAEA<sub>0,35</sub> liegt dieser Wert bei 64 %. Des Weiteren wird die Inhibition der ROS-Bildung in den Verdünnungsstufen 1:2 und 1:10 betrachtet. Bei einer Verdünnung von 1:2 von AC-TAEA<sub>0,56</sub> beträgt die Inhibition der ROS-Bildung 32 % und bei einer Verdünnung von 1:10 4 %. Dieser Trend zeigt sich ebenfalls bei AC-TAEA<sub>0,35</sub> mit Werten von 35 % (Verdünnung 1:2) bzw. 6 % (Verdünnung 1:10).

Für AC mit EDA-Funktionalisierung kann die Fähigkeit, die ROS-Bildung zu hemmen, nicht gezeigt werden (Abbildung 3-3 a). Auch mit Hinblick auf eine antioxidative Wirkung gegenüber RNS ist für AC mit EDA-Funktionalisierung, als auch mit TAEA-Funktionalisierung, keine Hemmung nachweisbar (Abbildung 3-3 b).



**ABBILDUNG 3-3** Antioxidative Wirkung von AC auf ROS (a) und RNS (b). Nur AC mit TAEA-Funktionalisierung sind in der Lage ROS zu inhibieren. AC weisen keine antioxidative Wirkung gegenüber RNS auf.

### 3.4 Antimikrobielle Wirkung der AC auf *C. albicans*

Die antimikrobielle Wirkung der AC auf *C. albicans* wurde mit zwei unterschiedlichen Untersuchungsmethoden analysiert. Mit Hilfe der MTP-Lasernephelometrie (MLN) wurden Wachstumskurven entsprechend der Generationszeit von *C. albicans* über einen Zeitraum von 24 h aufgenommen.

Bei diesem optischen Analyseverfahren wird die Trübung einer Lösung quantitativ bestimmt. Desto größer die Anzahl der Partikel in einer Lösung ist, desto stärker wird der Laserstrahl gestreut. Dieser kann dabei, ausgehend vom Primärstrahl, bis zu einem Winkel von 80° detektiert werden.

Im Gegensatz zur MTP-Lasernephelometrie, beruht der Nachweis des mikrobiellen ATP-Gehalts auf einer enzymatischen Reaktion, bei welcher ein biolumineszentes Signal über das Enzym Luciferase des Leuchtkäfers *Photuris pennsylvanica* erzeugt wird. Der ATP-Gehalt liefert Rückschlüsse auf metabolisch aktive Mikroorganismen. Hierbei ist die Biolumineszenz proportional zu der Menge an ATP, welche wiederum direkt proportional zur Anzahl der lebenden Mikroorganismen ist.

#### 3.4.1 Einfluss auf das mikrobielle Wachstum

Hinsichtlich der antimikrobiellen Wirksamkeit gibt es keine Unterschiede zwischen den beiden untersuchten *Candida*-Stämmen. Daher repräsentieren die folgenden Abbildungen stellvertretend Ergebnisse für beide *Candida*-Stämme. Hierbei erfolgt keine Unterteilung der Ergebnisse in *C. albicans* DSM 1386 und *C. albicans* ATCC MYA-2876.

Die Ergebnisse der nephelometrischen Wachstumsuntersuchung von *C. albicans* unter dem Einfluss von AC zeigen eine konzentrationsabhängige Wirkung aller AC gegenüber den Hefepilzen (Abbildung 3-4). Mit zunehmender AC-Konzentration ist eine Abnahme der mikrobiellen Zellen zu erkennen.

Bei den Wachstumskurven von *C. albicans*, welche nicht mit AC inkubiert wurden (Wachstums- oder Negativ-Kontrolle, dargestellt durch die schwarze Kurve in Abbildung 3-4 a bis d) ist ein typischer Verlauf des mikrobiellen Wachstums erkennbar. Zu Beginn der Inkubation ist zunächst die Anlaufphase zu erkennen. In dieser Phase passen sich die Hefezellen an die neuen Umgebungsbedingungen an. Nach ca. 6 h beginnt *C. albicans* sich zu vermehren. Hierbei ist ein exponentielles Wachstum erkennbar, welches nach ca. 14 h sein Maximum erreicht und sich die Absterbephase anschließt.

Bei der Positiv-Kontrolle mit CHX, dargestellt durch die rotgestrichelte Linie in Abbildung 3-4 a bis d, ist eine Hemmung des mikrobiellen Wachstums zu erkennen.

Bei der Inkubation von *C. albicans* mit niedrigen AC-Konzentrationen (20 µg/ml und 39 µg/ml; Abbildung 3-4) sind ähnlich zur Wachstumskontrolle typische Wachstumsverläufe erkennbar, wobei meist geringere Maxima erreicht werden (Abbildung 3-4 a, b und d). Bei einer AC-Konzentration von

78 µg/ml zeigen sich bei der Inkubation von *C. albicans* mit AC-EDA<sub>0,45</sub> und AC-TAEA<sub>0,35</sub> Abweichungen im Erscheinungsbild der typischen Wachstumskurven (Abbildung 3-4 a und c). Ein weiterer Unterschied beim Vergleich der Einflüsse der unterschiedlichen AC auf das Wachstum von *C. albicans* ist bei AC-EDA<sub>0,45</sub> zu beobachten. Hierbei sind ab einer AC-Konzentration von 156 µg/ml (Abbildung 3-4 a) nur geringe Trübungswerte bestimmbar. Ab einer AC-Konzentration von 313 µg/ml gibt es keine Hinweise auf mikrobielles Wachstum. Diese Beobachtung trifft auch für AC mit hohen DS-Werten zu (Abbildung 3-4 b und d).

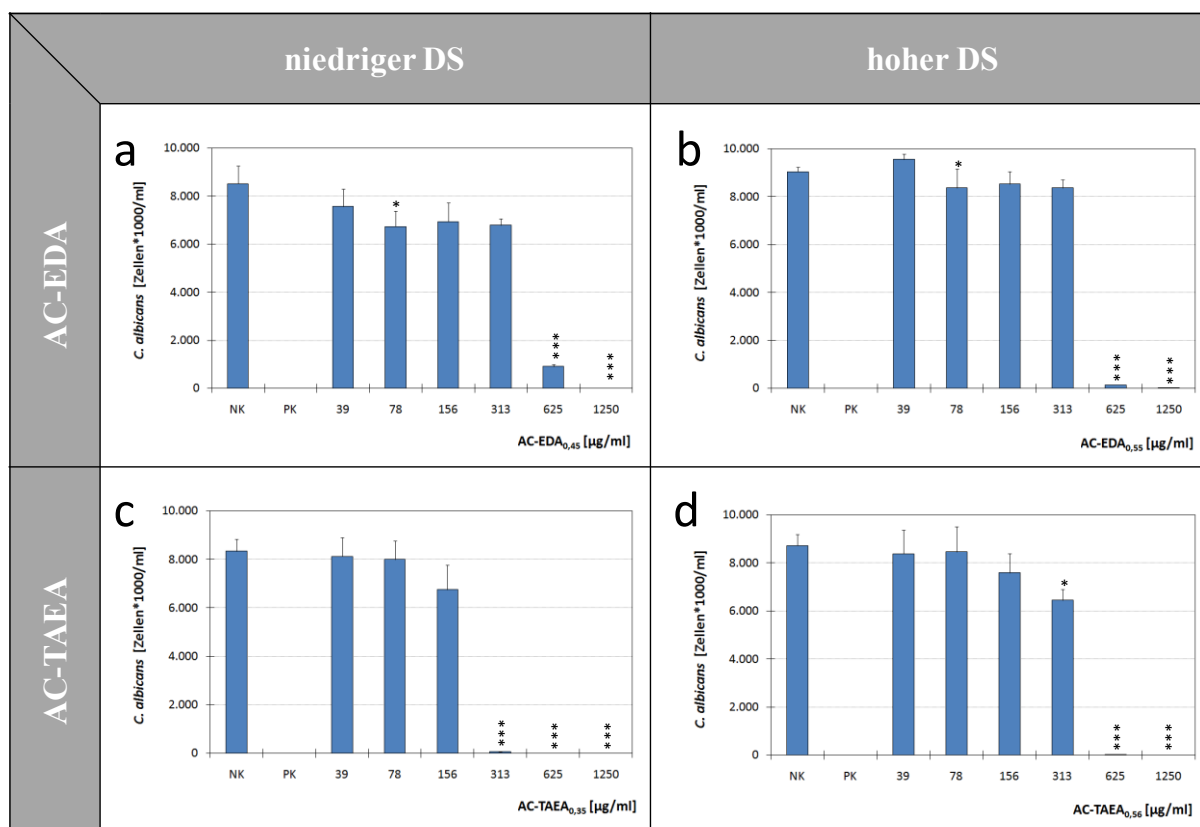
Bei der Inkubation von *C. albicans* mit AC-EDA<sub>0,55</sub> ist bei einer Konzentration von 313 µg/ml eine Trübung der Lösung nachweisbar (Abbildung 3-4 c). Wobei keine typische Wachstumskurve erkennbar ist. Für diese AC ist ab einer Konzentration von 625 µg/ml kein mikrobielles Wachstum mit dieser Methode nachweisbar.



**ABBILDUNG 3-4** Nachweis der antimikrobiellen Wirkung unterschiedlicher AC-Konzentrationen (20 µg/ml bis 1250 µg/ml; AC-EDA<sub>0,45</sub>: a, AC-EDA<sub>0,55</sub>: b, AC-TAEA<sub>0,35</sub>: c und AC-TAEA<sub>0,56</sub>: d) auf *C. albicans* anhand der Wachstumsuntersuchung im MTP-Nephelometer über einen Inkubationszeitraum von 24 h. Zum Vergleich der antimikrobiellen Wirkung der AC wurden bei den Versuchen eine Negativ-Kontrolle (NK oder Wachstumskontrolle) und eine Positiv-Kontrolle (PK mit CHX) mitgeführt. Bei allen AC zeigt sich eine konzentrationsabhängige Wirkung gegenüber *C. albicans*.

Anhand der biochemischen Untersuchung des mikrobiellen ATP-Gehalts nach 24-stündiger Inkubation von *C. albicans* mit AC lässt sich eine Abhängigkeit der Funktionalisierung der AC anhand der antimikrobiellen Wirkung erkennen.

Die metabolische Aktivität von *C. albicans* kann mit AC, welche mit TAEA ausgerüstet sind, stärker gehemmt werden, als es für AC mit EDA als funktioneller Gruppe der Fall ist (Abbildung 3-5). Bei einer AC-TAEA<sub>0,35</sub>-Konzentration von 313 µg/ml ist nahezu keine metabolische Aktivität nachweisbar (Abbildung 3-5 c). Im Vergleich dazu ist dieser Effekt erst bei einer AC-TAEA<sub>0,56</sub>-Konzentration von 625 µg/ml (Abbildung 3-5 d) zu erkennen. Diese Beobachtung zeigt sich auch größtenteils bei AC mit EDA-Funktionalisierung (Abbildung 3-5 a und b). Mit Ausnahme von AC-TAEA<sub>0,35</sub> ist bei allen getesteten AC bis zu einer AC-Konzentration von 313 µg/ml ATP nachweisbar (Abbildung 3-5 a, b und d).

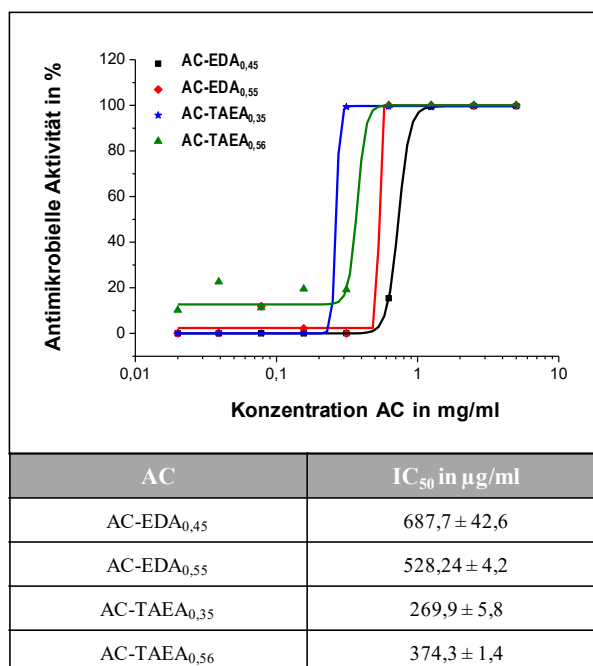


**ABBILDUNG 3-5** Nachweis der antimikrobiellen Wirkung von AC (AC-EDA<sub>0,45</sub>: a, AC-EDA<sub>0,55</sub>: b, AC-TAEA<sub>0,35</sub>: c und AC-TAEA<sub>0,56</sub>: d) auf *C. albicans* anhand der Bestimmung des mikrobiellen ATP-Gehalts im Anschluss an die nephelometrische Untersuchung. Bei allen AC zeigt sich eine konzentrationsabhängige Wirkung gegenüber *C. albicans*.

Einen deutlicheren Unterschied in Hinsicht auf die antimikrobielle Wirkung zeigen jedoch die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte, bei denen 50 % der Hefezellen im Wachstum gehemmt sind (Abbildung 3-6). Zur Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte wurden die Ergebnisse aus der Bestimmung des mikrobiellen ATP-Gehalts verwendet. Mit den Ergebnissen anhand der nephelometrischen Wachstumsuntersuchung war keine Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte möglich.

Der ermittelte IC<sub>50</sub>-Wert für AC-EDA<sub>0,45</sub> ist mit rund 690 µg/ml (Abbildung 3-6) im Vergleich zu den anderen Werten am höchsten. Dies spricht für die geringste antimikrobielle Wirkung im Vergleich zu den anderen AC. Ein besserer Effekt wird mit AC-EDA<sub>0,55</sub> erzielt, wobei in diesem Fall die mittlere

inhibitorische Konzentration ca. 530  $\mu\text{g/ml}$  beträgt (Abbildung 3-6). Die stärkste antimikrobielle Wirkung zeigt AC-TAEA<sub>0,35</sub> mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 270  $\mu\text{g/ml}$  (Abbildung 3-6).



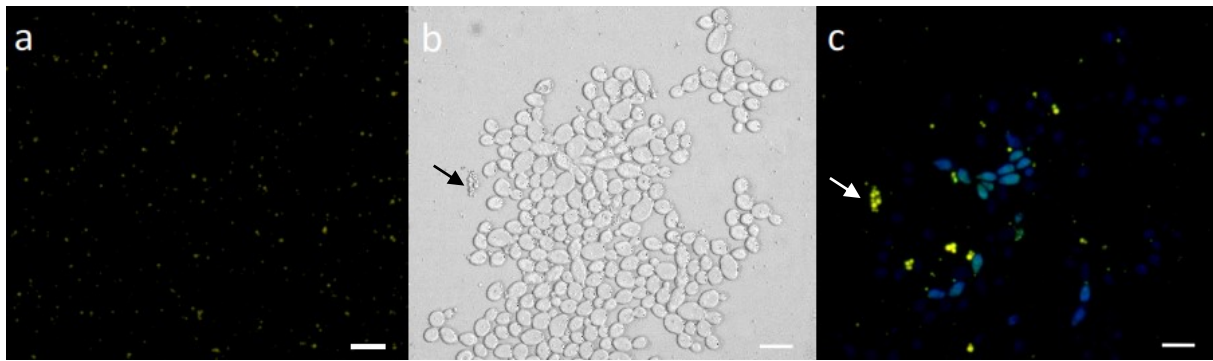
**ABBILDUNG 3-6** Auftragung der Dosis-Wirkungs-Beziehung der AC im Zusammenhang der antimikrobiellen Aktivität gegenüber *C. albicans*. Unterhalb des Diagramms sind die jeweiligen IC<sub>50</sub>-Werte aufgelistet.

Bei den ausplattierten Proben, welche bei der nephelometrischen Untersuchung kein sichtbares mikrobielles Wachstum aufwiesen, wurde auf eine fungistatische bzw. fungizide Wirkung der AC geprüft. Mit dieser Untersuchung kann für jede AC eine fungizide Wirkung bestätigt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Für die Positiv-Kontrolle mit CHX wird ebenfalls eine fungizide Wirkung nachgewiesen.

Für AC mit niedrigen DS-Werten (0,35 und 0,45) wird jeweils eine fungizide Konzentration von 625  $\mu\text{g/ml}$  ermittelt. Für AC mit hohem DS (0,55 und 0,56) ist eine fungizide Wirkung ab einer Konzentration von 1250  $\mu\text{g/ml}$  bestimmbar.

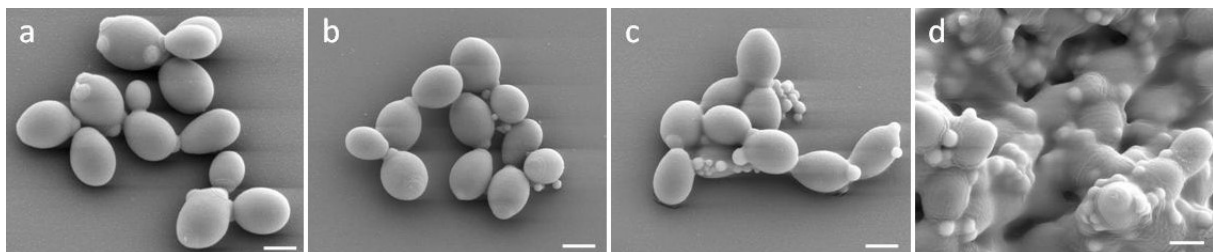
### 3.4.2 Mikroskopische Analyse von *C. albicans* nach Inkubation mit AC

Nachdem *C. albicans* mit AC inkubiert wurde, zeigen sich in der mikroskopischen Betrachtung kleine Partikel, welche den Hefezellen nicht zuordenbar sind. Diese sind rings um die Hefezellen zu finden, aber nicht bei den Kontrollen ohne AC. Hierbei wird vermutet, dass es sich bei den Partikeln um AC handelt. Diese Vermutung wird mit Hilfe einer fluoreszierenden AC überprüft. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigen sich bei dieser AC fluoreszierende Partikel (Abbildung 3-7 a), welche auch in der Durchlichtmikroskopie erkennbar sind (Abbildung 3-7 b). Zudem zeigen sich, dass auch einige Hefezellen bei der Fluoreszenzmikroskopie blau fluoreszieren (Abbildung 3-7 c).



**ABBILDUNG 3-7** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der fluoreszierenden AC (a). Durchlicht-(b) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (c) von *C. albicans*, inkubiert mit einer fluoreszierenden AC. Die Pfeile markieren auffällige gelbfluoreszierende Partikel, bei denen es sich um AC handelt. Einige Hefezellen fluoreszieren blau. Die Balkenlänge entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

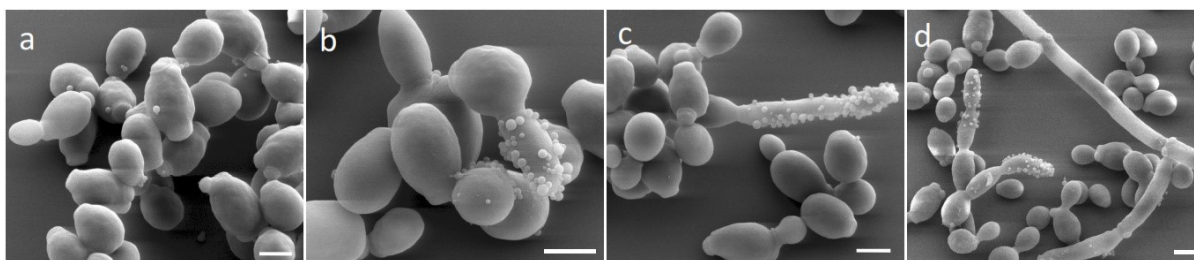
Anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen können die Beobachtungen der Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Bei diesen Aufnahmen zeigt sich mit zunehmender AC-Konzentration eine Zunahme der Partikelmenge. Diese bläschenartigen Strukturen sind kleiner, als die Hefezellen und häufig mit diesen assoziiert (Abbildung 3-8 b und c). Ab einer AC-Konzentration von 625  $\mu\text{g/ml}$  zeigt sich in der Elektronenmikroskopie eine Art Film, welcher die Hefezellen und die bläschenartigen Strukturen umhüllt (Abbildung 3-8 d).



**ABBILDUNG 3-8** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. albicans*. *C. albicans* wurde über 24 h mit verschiedenen AC-Konzentrationen inkubiert. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (a) zeigen sich mit steigender AC-Konzentration (a: 156  $\mu\text{g/ml}$  und b: 313  $\mu\text{g/ml}$ ) bläschenartige Strukturen an den Blastosporen. Bei einer AC-Konzentration von 625  $\mu\text{g/ml}$  (d) sind die Blastosporen von einem dichten Film umhüllt. Die Balkenlänge entspricht 2  $\mu\text{m}$ .

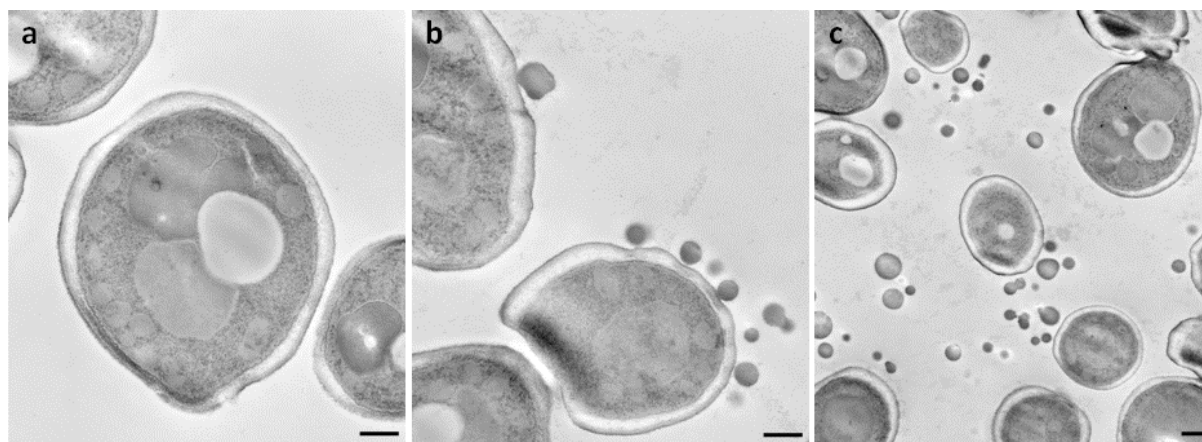
Bei der Inkubation von *C. albicans* mit einer AC-Konzentration von 313  $\mu\text{g/ml}$  über einen längeren Zeitraum (24 h bis 96 h), zeigt sich in der Elektronenmikroskopie ebenfalls eine Assoziation der bläschenartigen Strukturen mit den Hefezellen (Abbildung 3-9). Ab einer Inkubationszeit von 48 h zeigen sich an Pseudohyphen vermehrt und in großer Anzahl die auffälligen Strukturen, welche mit AC in Verbindung zu bringen sind.





**ABBILDUNG 3-9** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. albicans*. *C. albicans* wurde über verschiedene Zeiträume mit einer AC-Konzentration von 313 µg/ml inkubiert. Nach 24 h (a) zeigen sich an den Blastosporen bläschenartige Strukturen. Diese sind nach 48 h (b), 72 h (c) und 96 h (d) hauptsächlich mit Pseudohyphen assoziiert. Die Balkenlänge entspricht 2 µm.

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die Hefezellen im Querschnitt. Hierbei wurde untersucht, ob die bläschenartigen Strukturen mit der Oberfläche der Hefezellen assoziiert sind. Im Vergleich zur Kontrollaufnahme (Abbildung 3-10 a) sind bei den Aufnahmen von *C. albicans* nach 24-stündiger Inkubation mit AC bläschenartige Strukturen erkennbar (Abbildung 3-10 b und c). Anhand der Aufnahmen lässt sich eine Assoziation der AC-Partikel mit den Zellwänden der Hefezellen erkennen. Zum Teil liegen aber auch AC-Partikel ohne eine Verbindung zu *C. albicans* vor (Abbildung 3-10 c). Bei diesen Bildern sind keine morphologischen Änderungen innerhalb und außerhalb der Hefezellen zu erkennen.



**ABBILDUNG 3-10** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. albicans* nach 24-stündiger Inkubation ohne (a) und mit AC (313 µg/ml, b und c). Die Balkenlänge entspricht 500 nm.

### 3.5 Zellverträglichkeit der AC im 2d-HaCaT-Kulturmodell

Die Zellverträglichkeit bzw. Biokompatibilität der AC wurden in einem 2d-HaCaT-Kulturmodell mit biochemischen und immunbiologischen Methoden analysiert. Die Viabilität der humanen Zellen wurde hierbei luminometrisch anhand des zytosolischen ATP-Gehalts bestimmt. Der ATP-Gehalt einer Zelle gibt Aufschluss über deren metabolische Aktivität. Bei nekrotischen und apoptotischen Zellen nimmt der zytosolische Gehalt an ATP rapide ab. Somit ermöglicht der ATP-Nachweis Rückschlüsse hinsichtlich der Zellproliferation und der Lebend-Zellzahl. Dieser hochempfindliche Nachweis beruht auf der Produktion von Licht durch das Enzym Luciferase. Das emittierte Licht ist

dabei proportional zum ATP-Gehalt, welcher sich wiederum proportional zur Lebend-Zellzahl verhält. Mit diesem Nachweis können bereits Hinweise auf zytotoxische Eigenschaften der Testsubstanzen aufgezeigt werden.

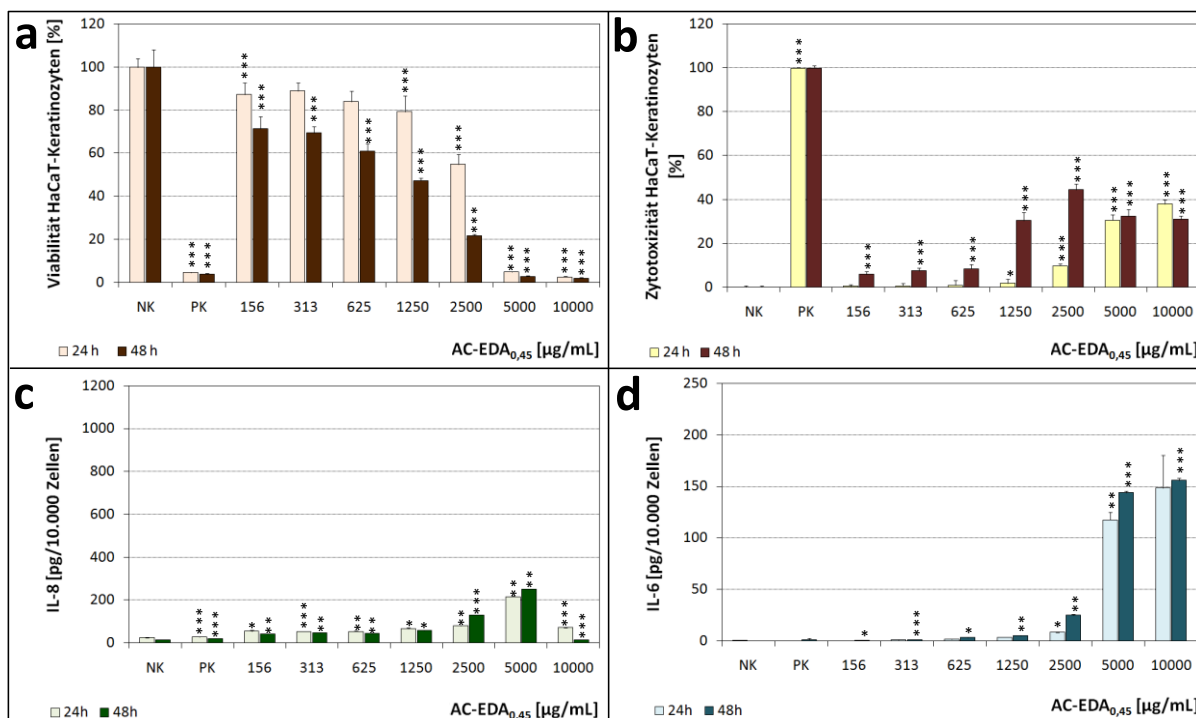
Die Überprüfung des zytotoxischen Potentials erfolgt spezifisch mit einem quantitativen Assay zum Nachweis des Enzyms LDH. Dieses stabile zytosolische Enzym wird bei nekrotischen Zellen infolge von Membranschädigungen freigesetzt und kann daher im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Der Nachweis von LDH beruht auf der Umwandlung eines Tetrasoliums Salzes in einen roten Formazanfarbstoff. Dieser Farbstoff ist proportional zur Anzahl lysierter Zellen.

Anhand von immunologischen Assays wurde die Freisetzung der Interleukine IL-6 und IL-8 quantitativ bestimmt. Der proinflammatorische Nachweis beruht auf der spezifischen Bindung der Interleukine an monoklonale Antikörper. Über einen zweiten biotinylierten Antikörper und eine Streptavidin-konjugierte Peroxidase wird über das Substrat TMB ein blaues Reaktionsprodukt freigesetzt. Je intensiver die Blaufärbung einer Lösung ist, desto höher ist die Menge an Interleukin. Anhand von Standardkurven lassen sich die Mengen an freigesetzten Interleukinen quantitativ bestimmen.

### **3.5.1 Viabilität, Zytotoxizität und Freisetzung von Interleukinen im 2d-HaCaT-Kulturmodell**

Die Ergebnisse der Untersuchungen hinsichtlich der Viabilität der HaCaT-Keratinocyten nach 24-stündiger Inkubation mit AC-EDA<sub>0,45</sub> zeigen eine hohe Zellverträglichkeit. Erst ab einer AC-Konzentration von 2500 µg/ml ist die Viabilität der humanen Keratinocyten im Vergleich zur Wachstumskontrolle um ca. 40 % vermindert (Abbildung 3-11 a). Bei einer AC-Konzentration von 5000 µg/ml nimmt die Viabilität um 90 % ab und es lässt sich eine zytotoxische Wirkung erkennen (Abbildung 3-11 b). Nach einer 48-stündigen Inkubation zeigt sich bereits ab einer AC-Konzentration von 1250 µg/ml ein Effekt auf die Viabilität der humanen Zellen.

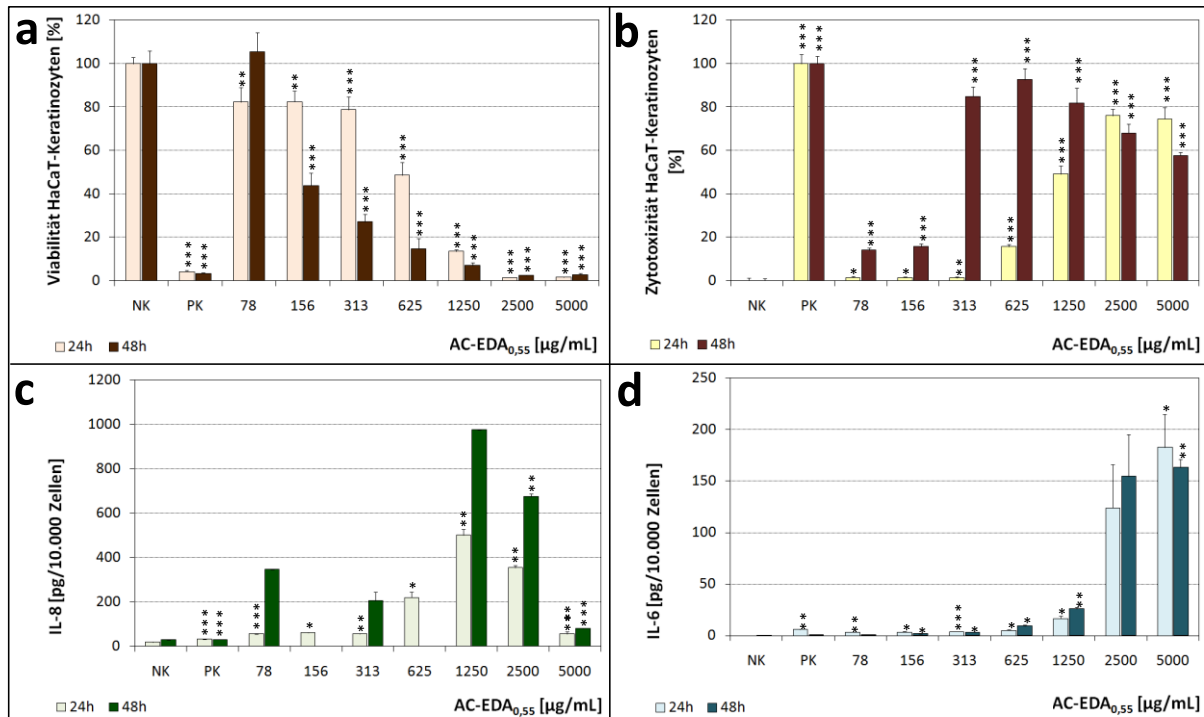
Ab einer AC-Konzentration von 2500 µg/ml ist ebenfalls eine erhöhte Freisetzung von Interleukinen, insbesondere von IL-6 zu erkennen (Abbildung 3-11 d). Für IL-8 wird ein Maximum der Freisetzung bei einer 1:2 verdünnten AC-Lösung erreicht (Abbildung 3-11 c).



**ABBILDUNG 3-11** Die Viabilität der HaCaT-Keratinocyten nach 24- bzw. 48-stündiger Behandlung mit AC-EDA<sub>0,45</sub> wurde anhand des zytosolischen ATP-Gehalts bestimmt (a). Das zytotoxische Potential wurde anhand des Nachweises von LDH ermittelt (b). Die freigesetzten Mengen an IL-8 (c) und IL-6 (d) in das Zellkulturmedium wurden mittels ELISA quantifiziert.

Hinsichtlich der Verträglichkeit der EDA-funktionalisierten AC mit einem DS von 0,55 zeigt sich nach 24-stündiger Inkubation der HaCaT-Keratinocyten ab einer AC-Konzentration von 625 µg/ml eine Abnahme der Zellviabilität um ca. 50 % (Abbildung 3-12 a). Mit zunehmender AC-Konzentration ist eine weitere Abnahme der Zellviabilität erkennbar. Eine zytotoxische Wirkung ist ab einer AC-Konzentration von 1250 µg/ml nachweisbar (Abbildung 3-12 b). Im Gegensatz dazu, zeigt sich nach 48-stündiger Inkubation ab einer AC-Konzentration von 156 µg/ml eine Abnahme der Zellviabilität (Abbildung 3-12 a). Nach dieser Inkubationszeit wird bei einer AC-Konzentration von 313 µg/ml eine zytotoxische Wirkung (über 80 %) erreicht (Abbildung 3-12 b).

Bei der Freisetzung von Interleukinen in das Zellkulturmedium ist nach 24 h eine Zunahme von IL-8 und IL-6 ab einer AC-Konzentration von 625 µg/ml mittels ELISA nachweisbar. Für IL-8 ist nach 48 h bei einer AC-Konzentration von 78 µg/ml die freigesetzte Menge im Vergleich zur Negativ-Kontrolle 10 fach höher (Abbildung 3-12 c).

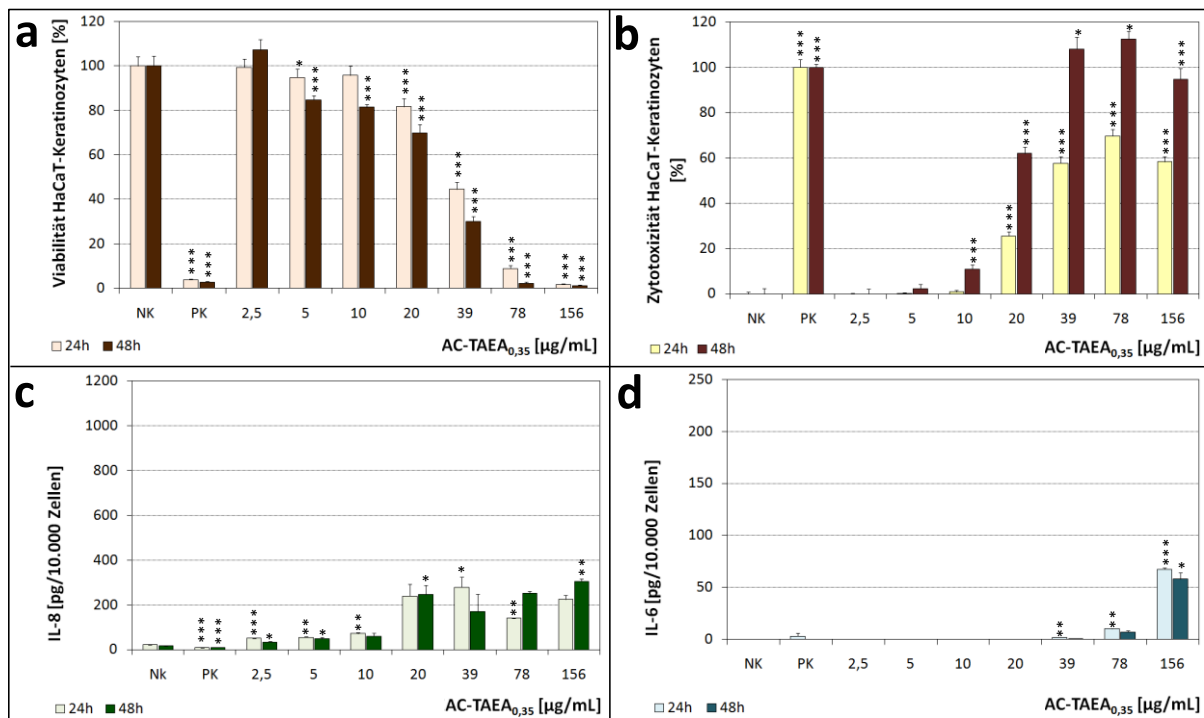


**ABBILDUNG 3-12** Die Viabilität der HaCaT-Keratinocyten nach 24- bzw. 48-stündiger Behandlung mit AC-EDA<sub>0,55</sub> wurde anhand des zytosolischen ATP-Gehalts bestimmt (a). Das zytotoxische Potential wurde anhand des Nachweises des Enzyms LDH ermittelt (b). Die freigesetzten Mengen an IL-8 (c) und IL-6 (d) in das Zellkulturmedium wurden mittels ELISA quantifiziert.

Im Vergleich zu den AC mit EDA-Funktionalisierung umfasst der getestete Konzentrationsbereich bei AC mit TAEA als funktioneller Gruppe in den 2d-HaCaT-Keratinocytenmodellen niedrigere AC-Konzentrationen.

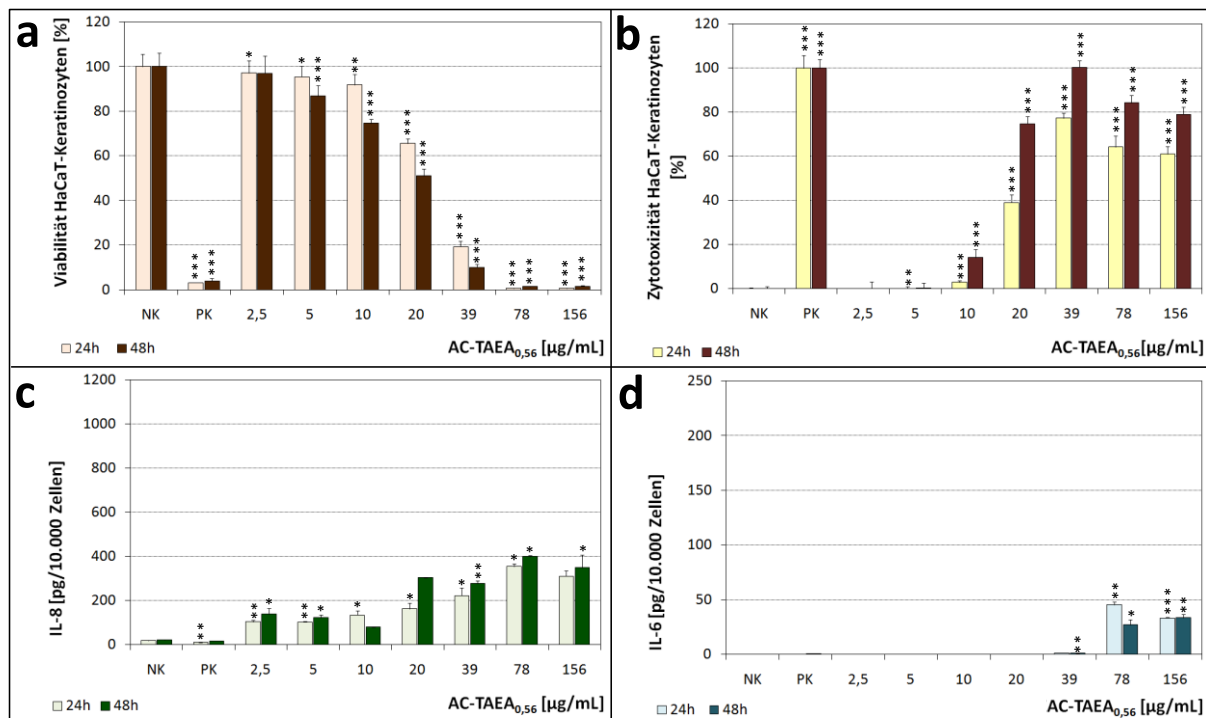
Für AC-TAEA<sub>0,35</sub> zeigt sich bei einer AC-Konzentration von 39 µg/ml ein Rückgang der Zellviabilität um 60 % (nach 24 h) bzw. 70 % (nach 48 h) (Abbildung 3-13 a). Dementsprechend ist eine Zunahme der zytotoxischen Wirkung dieser AC auf die HaCaT-Keratinocyten erkennbar (Abbildung 3-13 b).

Anhand der ELISA-Ergebnisse für IL-8 ist bei einer AC-Konzentration von 20 µg/ml, im Vergleich zur Negativ-Kontrolle, eine 10-fach höhere Menge an freigesetztem Interleukin nachweisbar (Abbildung 3-13 c). Ab einer AC-Konzentration von 78 µg/ml ist eine erhöhte Ausschüttung an IL-6 erkennbar (Abbildung 3-13 d).



**ABBILDUNG 3-13** Die Viabilität der HaCaT-Keratinocyten nach 24- bzw. 48-stündiger Behandlung mit AC-TAEA<sub>0,35</sub> wurde anhand des zytosolischen ATP-Gehalts bestimmt (a). Das zytotoxische Potential wurde anhand des Nachweises des Enzyms LDH ermittelt (b). Die freigesetzten Mengen an IL-8 (c) und IL-6 (d) in das Zellkulturmedium wurden mittels ELISA quantifiziert.

Bei HaCaT-Keratinocytenmodellen, welche 24 h mit AC-TAEA<sub>0,56</sub> behandelt wurden, zeigt sich ab einer AC-Konzentration von 20 µg/ml eine Abnahme der Zellviabilität um ca. 35 % (Abbildung 3-14 a). Dieser Wert ist nach 48-stündiger Inkubation 15 % größer. Mit zunehmender AC-Konzentration nimmt die Viabilität der HaCaT-Keratinocyten weiterhin ab. Zytotoxische Effekte auf die Zellen sind bei einer AC-Konzentration von 20 µg/ml anhand des LDH-Nachweises messbar (Abbildung 3-14 b). In den untersuchten Zellkulturüberständen sind nach 24 h bei der niedrigsten AC-Konzentration im Vergleich zur Negativ-Kontrolle 5-fach höhere Mengen an IL-8 nachweisbar, welche mit steigender AC-Konzentration weiterhin zunehmen (Abbildung 3-14 c). Für IL-6 ist ab einer AC-Konzentration von 78 µg/ml eine Zunahme an freigesetztem Interleukin erkennbar (Abbildung 3-14 d).

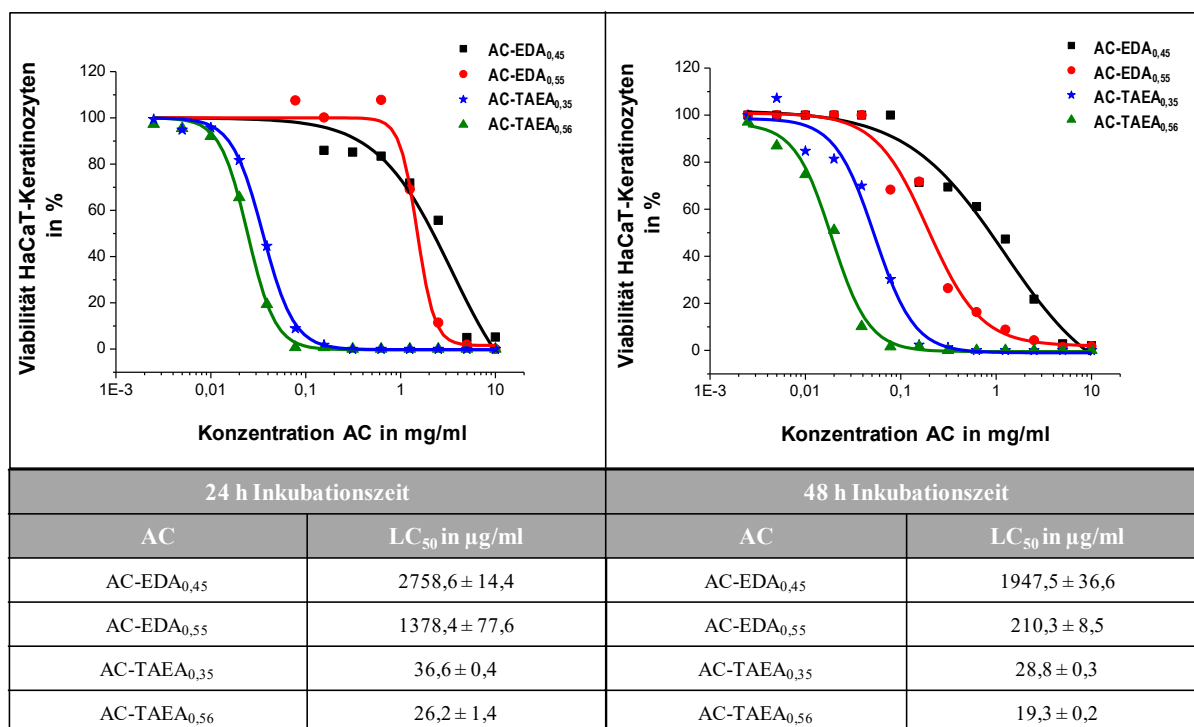


**ABBILDUNG 3-14** Die Viabilität der HaCaT-Keratinocyten nach 24- bzw. 48-stündiger Behandlung mit AC-TAEA<sub>0,56</sub> wurde anhand des zytosolischen ATP-Gehalts bestimmt (a). Das zytotoxische Potential wurde anhand des Nachweises des Enzyms LDH ermittelt (b). Die freigesetzten Mengen an IL-8 (c) und IL-6 (d) in das Zellkulturmedium wurden mittels ELISA quantifiziert.

### 3.5.2 Vergleich der LC<sub>50</sub>-Werte nach 24- und 48-stündiger Inkubation der HaCaT-Keratinocyten mit AC

Die LC<sub>50</sub>-Werte wurden anhand der Ergebnisse der Viabilitätsuntersuchung in 2d-HaCaT-Keratinocytenmodellen mittels der grafischen Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung berechnet. Hierbei wird die Viabilität der humanen Zellen in Abhängigkeit von der AC-Konzentration grafisch aufgetragen.

Beim Vergleich der ermittelten LC<sub>50</sub>-Werte lässt sich ein Zusammenhang zwischen funktioneller Gruppe der AC und der Verträglichkeit gegenüber HaCaT-Keratinocyten erkennen. Für AC mit EDA-Funktionalisierung sind die LC<sub>50</sub>-Werte höher, als für AC mit TAEA-Funktionalisierung (Abbildung 3-15). Zudem lässt sich hierbei eine Abhängigkeit der Verträglichkeit von AC gegenüber dem DS erkennen. Bei niedrigen DS sind die ermittelten LC<sub>50</sub>-Werte höher, als bei den entsprechenden AC mit größerem DS. Diese Beobachtungen zeigen sich nach 24- und 48-stündiger Inkubation der HaCaT-Keratinocyten mit AC. Im Vergleich zu den LC<sub>50</sub>-Werten, welche nach 24-stündiger Inkubation ermittelt wurden, sind die Werte nach 48 h insbesondere für die AC mit EDA-Funktionalisierung niedriger.



**ABBILDUNG 3-15** Grafische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung und Zusammenfassung der LC<sub>50</sub> im 2d-Zellkulturmodell nach 24- (links) und 48-stündiger Inkubation (rechts) mit verschiedenen AC.

### 3.5.3 Mikroskopische Analyse von HaCaT-Keratinocyten nach Inkubation mit AC

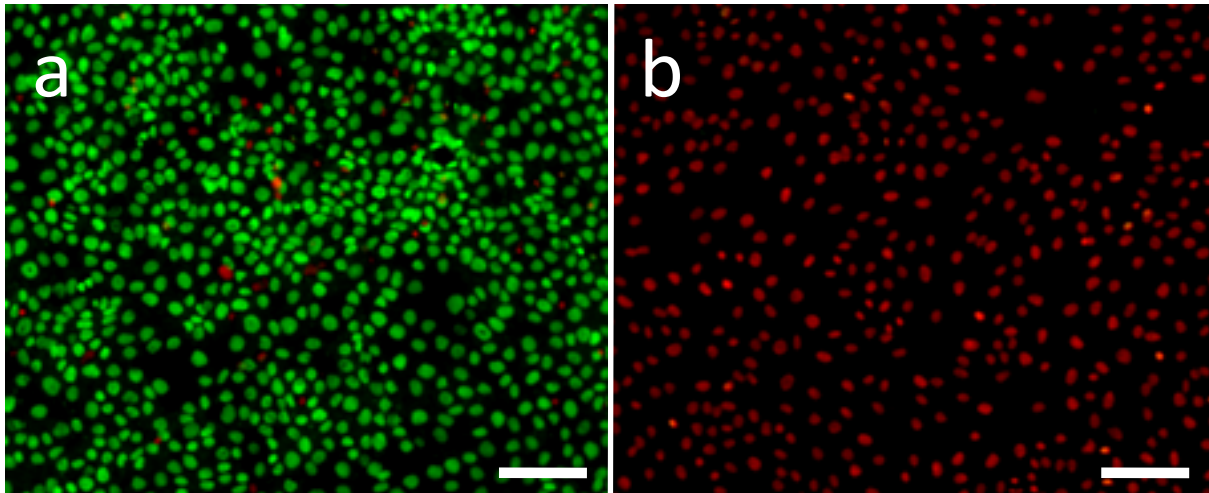
Zur mikroskopischen Beurteilung der Wirkung von AC auf HaCaT-Keratinocyten wurden diese mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 13 und EthD-2 angefärbt und mikroskopisch beurteilt.

Die Gemeinsamkeit beider Farbstoffe ist, dass sie an Nukleinsäuren binden. Der grünfluoreszierende Farbstoff SYTO 13 kann passiv durch die Zellmembran diffundieren. Im Inneren der Zellen bindet SYTO 13 an verschiedene Nukleinsäuren. Im Gegensatz dazu ist der rotfluoreszierende Farbstoff EthD-2 membranimpermeabel. Somit können durch diesen Farbstoff nur geschädigte oder defekte Zellen angefärbt werden. Da EthD-2 eine höhere Affinität zu DNA aufweist, als SYTO 13, ist EthD-2 in der Lage den grünfluoreszierenden Farbstoff zu verdrängen. Aufgrund dessen kommt es zu einer roten Fluoreszenz toter Zellen.

Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurden als Kontrollaufnahmen Fluoreszenzbilder von HaCaT-Keratinocyten angefertigt, welche zum einen als Negativ-Kontrolle für 24 h in Kulturmedium inkubiert wurden. Und zum anderen wurden HaCaT-Keratinocyten für 24 h mit 0,1 % Triton-X 100, als Positiv-Kontrolle für tote Zellen, inkubiert.

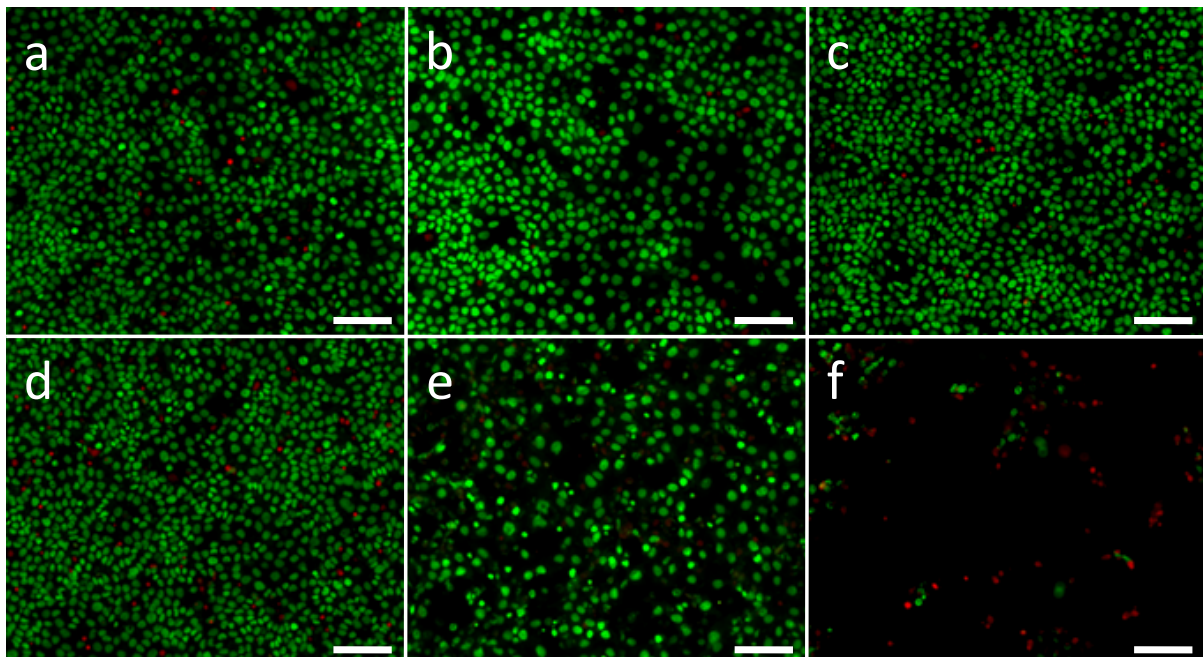
Nach dem Anfärben mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen, zeigen sich bei der Negativ-Kontrolle hauptsächlich grünfluoreszierende Zellkerne (Abbildung 3-16 a). Bei der Positiv-Kontrolle sind nur rotangefärbte Zellkerne zu erkennen (Abbildung 3-16 b).





**ABBILDUNG 3-16** HaCaT-Keratinocyten wurden nach 24-stündiger Inkubation in Kulturmedium (Negativ-Kontrolle, a) bzw. mit Triton-X 100 (Positiv-Kontrolle, b) mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 13 und EthD-2 angefärbt und am Mikroskop ausgewertet. Die Balkenlänge entspricht 100 µm.

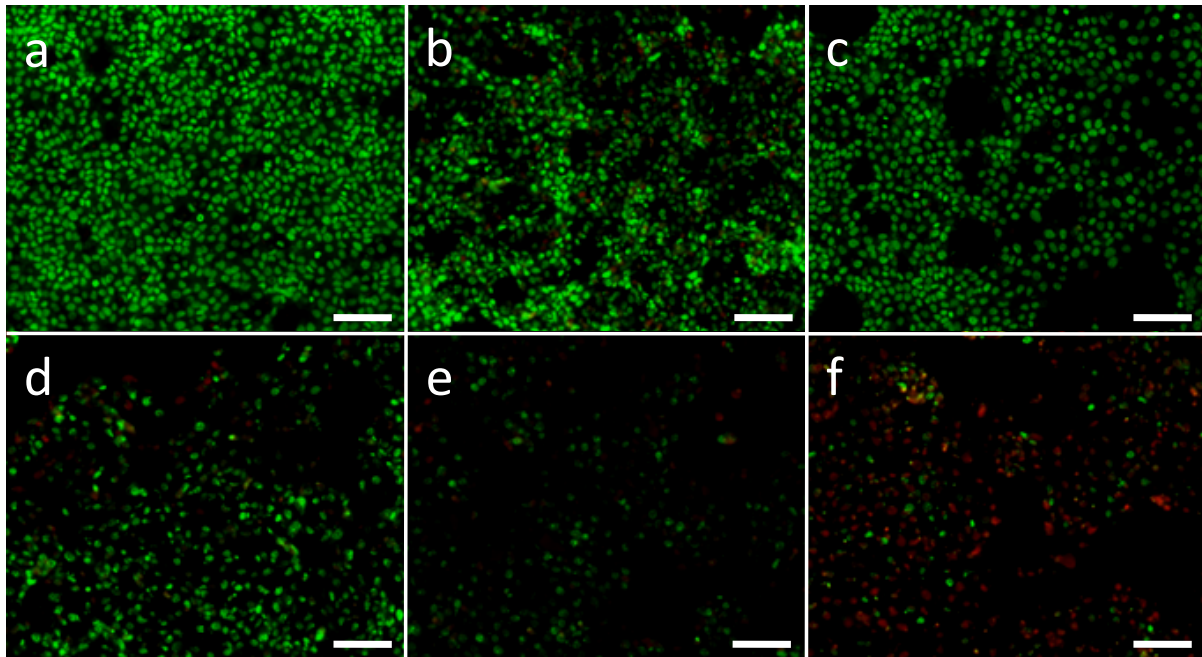
Nach 24-stündiger Inkubation der HaCaT-Keratinocyten mit AC-EDA<sub>0,45</sub> sind im Vergleich zur Negativ-Kontrolle erst ab einer AC-Konzentration von 2500 µg/mL deutliche Unterschiede erkennbar (Abbildung 3-17 e). Zum einen zeigen sich weniger grünfluoreszierende Zellkerne und die Form dieser wirkt inhomogener. Zum anderen erscheinen zwischen den Zellkernen größere Lücken. Ab einer AC-Konzentration von 5000 µg/ml (Abbildung 3-17 f) sind sehr vereinzelt grüne Zellkerne erkennbar und eine Zunahme rotfluoreszierender Zellkerne ist zu beobachten. Zudem hat die Zelldichte abgenommen.



**ABBILDUNG 3-17** HaCaT-Keratinocyten wurden nach 24-stündiger Inkubation mit AC-EDA<sub>0,45</sub> mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 13 und EthD-2 angefärbt und die Ergebnisse wurden am Mikroskop dokumentiert. Die HaCaT-Keratinocyten wurden mit 156 µg/ml AC-EDA<sub>0,45</sub> (a) bzw. mit 313 µg/ml (b), 625 µg/ml (c), 1250 µg/ml (d), 2500 µg/ml (e) oder 5000 µg/ml (f) inkubiert. Die Balkenlänge entspricht 100 µm.

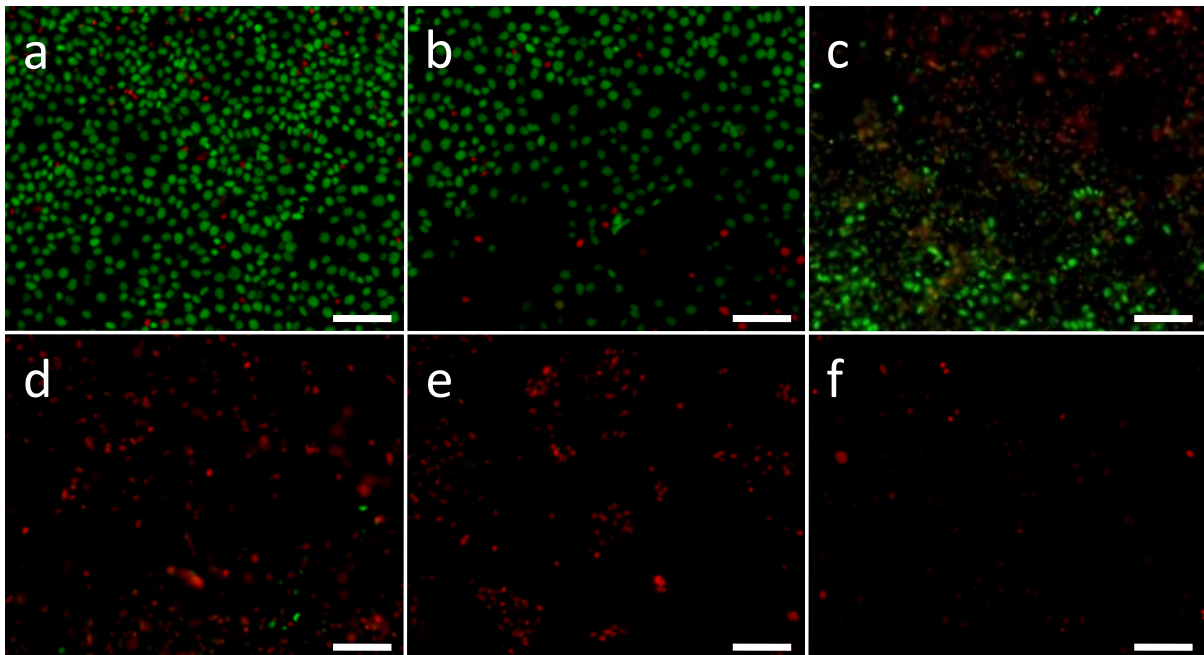


Wurden die HaCaT-Keratinocyten für 24 h mit AC-EDA<sub>0,55</sub> inkubiert, so zeigen sich bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ab einer AC-Konzentration von 313 µg/ml (Abbildung 3-18 b) Unterschiede zum Kontrollbild für lebende Zellen. Zwischen den Zellen sind größere Lücken erkennbar, welche mit steigender AC-Konzentration zunehmen. Bei einer AC-Konzentration von 5000 µg/ml sind vermehrt tote Zellen anhand der roten Fluoreszenz erkennbar (Abbildung 3-18 f).



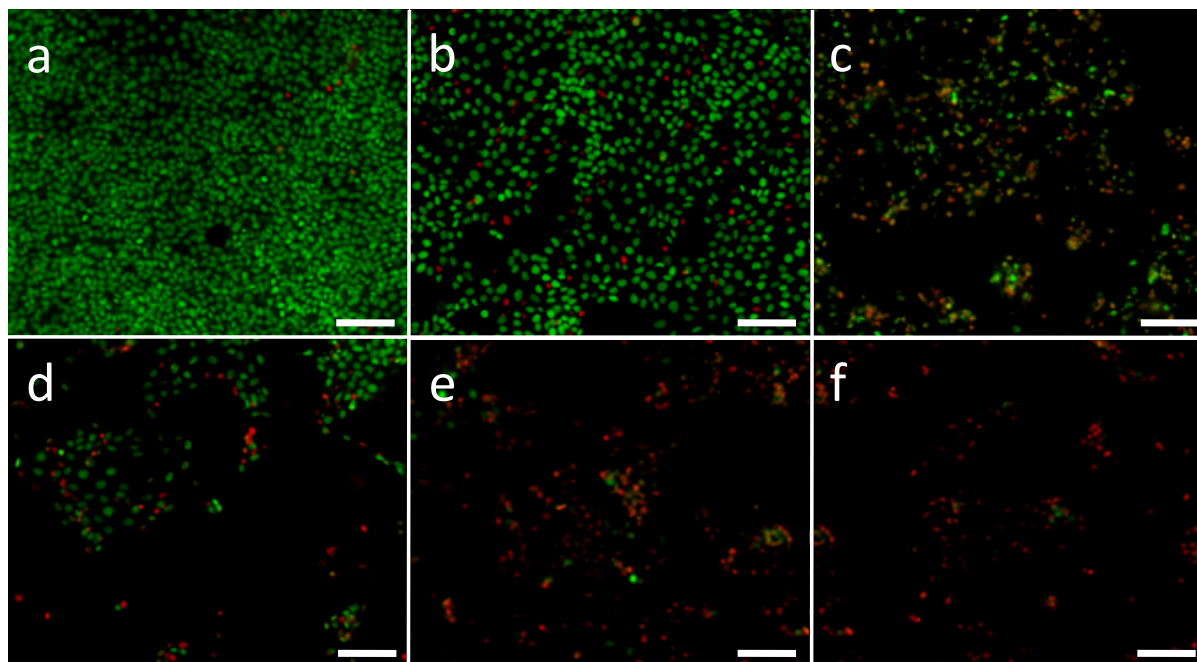
**ABBILDUNG 3-18** HaCaT-Keratinocyten wurden nach 24-stündiger Inkubation mit AC-EDA<sub>0,55</sub> mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 13 und EthD-2 angefärbt und die Ergebnisse wurden am Mikroskop dokumentiert. Die HaCaT-Keratinocyten wurden mit 156 µg/ml AC-EDA<sub>0,55</sub> (a) bzw. mit 313 µg/ml (b), 625 µg/ml (c), 1250 µg/ml (d), 2500 µg/ml (e) oder 5000 µg/ml (f) inkubiert. Die Balkenlänge entspricht 100 µm.

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von HaCaT-Keratinocyten, welche mit AC-TAEA<sub>0,35</sub> inkubiert wurden, zeigen sich ab einer AC-Konzentration von 20 µg/ml teilweise größere Lücken zwischen den Zellen (Abbildung 3-19 b). Mit steigender AC-Konzentration nimmt die Anzahl rotfluoreszierender Zellkerne zu (Abbildung 3-19 c-e). Bei einer AC-Konzentration von 156 µg/ml sind nur noch vereinzelt tote HaCaT-Keratinocyten erkennbar (Abbildung 3-19 f).



**ABBILDUNG 3-19** HaCaT-Keratinozyten wurden nach 24-stündiger Inkubation mit AC-TAEA<sub>0,35</sub> mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 13 und EthD-2 angefärbt und die Ergebnisse wurden am Mikroskop dokumentiert. Die HaCaT-Keratinozyten wurden mit 5 µg/ml AC-TAEA<sub>0,35</sub> (a) bzw. mit 10 µg/ml (b), 20 µg/ml (c), 39 µg/ml (d), 78 µg/ml (e) oder 156 µg/ml (f) inkubiert. Die Balkenlänge entspricht 100 µm.

Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von HaCaT-Keratinozyten nach 24-stündiger Inkubation mit AC-TAEA<sub>0,56</sub> sind ähnliche Effekte zu beobachten. Bei einer AC-Konzentration von 5 µg/ml sind die Zellen dicht und vital (Abbildung 3-20). Mit zunehmender AC-Konzentration sind größere Lücken zwischen den Zellen sichtbar und die Anzahl rot fluoreszierende Zellbestandteile nimmt zu (Abbildung 3-20 b-f).



**ABBILDUNG 3-20** HaCaT-Keratinocyten wurden nach 24-stündiger Inkubation mit AC-TAEA<sub>0,56</sub> mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 13 und EthD-2 angefärbt und die Ergebnisse wurden am Mikroskop dokumentiert. Die HaCaT-Keratinocyten wurden mit 5 µg/ml AC-TAEA<sub>0,56</sub> (a) bzw. mit 10 µg/ml (b), 20 µg/ml (c), 39 µg/ml (d), 78 µg/ml (e) oder 156 µg/ml (f) inkubiert. Die Balkenlänge entspricht 100 µm.

### 3.6 Zellverträglichkeit der AC im 2d-Co-Kulturmodell

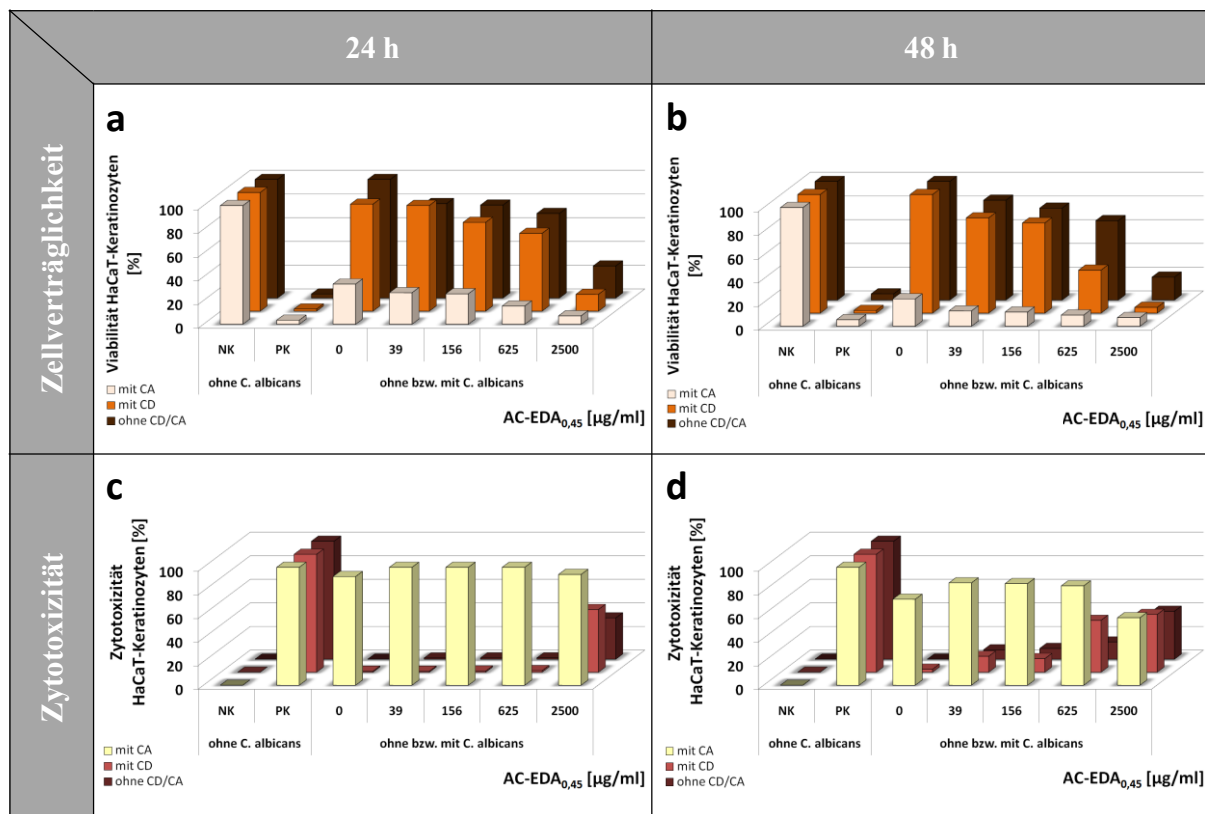
Die Untersuchungen hinsichtlich der Zellverträglichkeit von AC in 2d-Co-Kulturmodellen zwischen HaCaT-Keratinocyten und dem Hefepilz *C. albicans* wurden analog zu den Untersuchungen mit den nicht mit *Candida*-infizierten 2d-Kulturmodellen durchgeführt. Da insbesondere bei der Co-Kultivierung der humanen Zellen mit dem invasiv-wachsenden *C. albicans*-Stamm ATCC MYA-2876 die gut etabliert Untersuchungsmethode zum Nachweis des mikrobiellen ATP-Gehalts an ihre Grenzen stößt, aber auch die Aufzeichnung von mikrobiellen Wachstumskurven keine hinreichenden Ergebnisse lieferte, erfolgte neben den biochemischen und immunbiologischen Analysemethoden eine Quantifizierung der Hefepilze mittels qPCR.

#### 3.6.1 Viabilität, Zytotoxizität und Freisetzung von Interleukinen im 2d-Co-Kulturmodell

Beim Vergleich der Viabilität der HaCaT-Keratinocyten nach Inkubation mit AC-EDA<sub>0,45</sub> mit den Ergebnissen der Untersuchungen der Co-Kultivierung mit beiden Hefestämmen, zeigen sich nach Inkubation der HaCaT-Keratinocyten mit *C. albicans* DSM 1386 und AC-EDA<sub>0,45</sub> ähnliche Ergebnisse, wie nach Inkubation der HaCaT-Keratinocyten für 24 h und 48 h ohne dem Hefepilz (Abbildung 3-21 a und b). Dabei zeigt sich, dass mit zunehmender AC-Konzentration die Viabilität der HaCaT-Keratinocyten minimal beeinflusst wird. Ab einer AC-Konzentration von 625 µg/ml, zeigt sich nach 48-stündiger Inkubation der humanen Zellen mit *C. albicans* DSM 1386 und AC-EDA<sub>0,45</sub>

(Abbildung 3-21 b) ein Rückgang der Zellverträglichkeit um 64 %. Bei den nicht mit *C. albicans* DSM 1386 infizierten Keratinozyten ist bei dieser AC-Konzentration eine Minderung der Viabilität um 13 % zu beobachten. Bei höheren AC-Konzentrationen ist auch bei den nicht-infizierten Keratinozyten ein Rückgang der Viabilität zu erkennen (Abbildung 3-21 a und b). Diese Beobachtungen finden sich auch bei den Untersuchungen des zytotoxischen Potentials wieder (Abbildung 3-21 c und d).

Ein deutlicher Effekt auf die Viabilität der HaCaT-Keratinozyten ist bei der Co-Kultivierung mit dem invasiv-wachsendem *C. albicans*-Stamm ATCC MYA-2876 ohne AC zu erkennen (Abbildung 3-21 a). Bei der Inkubation des Co-Kulturmodells mit AC-EDA<sub>0,45</sub> nimmt mit steigender AC-Konzentration die Viabilität der HaCaT-Keratinozyten ab und das zytotoxische Potential ist mit 80 % bis 90 % sehr hoch.



**ABBILDUNG 3-21** Zellverträglichkeit (a und b) und Zytotoxizität (c und d) von AC-EDA<sub>0,45</sub> auf HaCaT-Keratinozyten im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts).

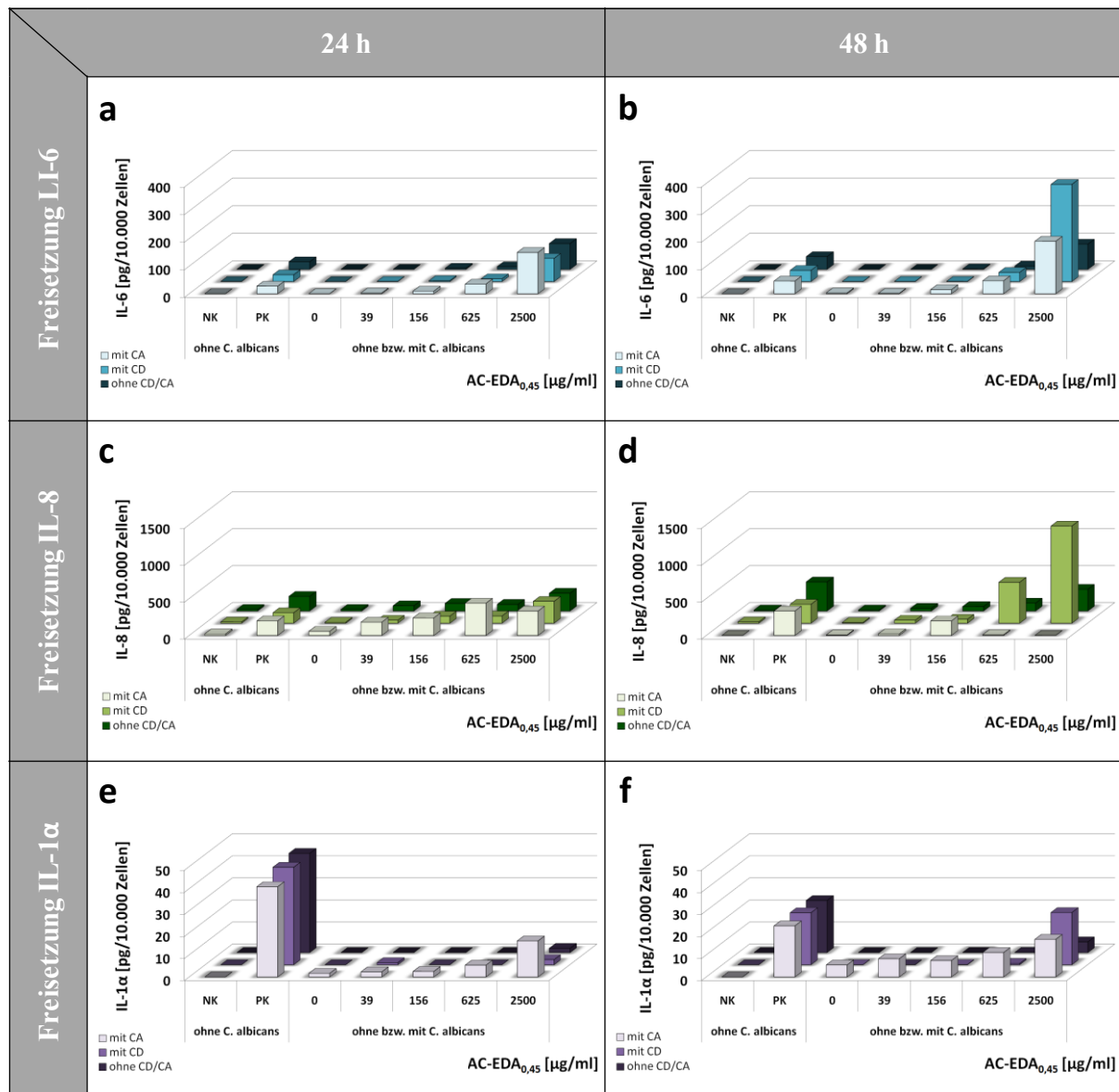
Mit den immunologischen Untersuchungen der Zellkulturüberstände der Co-Kulturmodelle, welche nach 24 h und 48 h gesammelt wurden, wurde die Freisetzung der Interleukine IL-6, IL-8 und IL-1 $\alpha$  mittels ELISA analysiert.

Bei einer Inkubation der HaCaT-Keratinozyten mit AC-EDA<sub>0,45</sub>, als auch bei der Co-Kultivierung mit den beiden Hefestämmen, zeigt sich bei einer AC-Konzentration von 2500  $\mu\text{g/ml}$  nach 24 h und 48 h eine hohe Ausschüttung von IL-6 (Abbildung 3-22 a und b). Im Vergleich zur Positiv-Kontrolle

entspricht dies nach 24 h einer 350- (Co-Kultivierung mit *C. albicans* DSM 1386) bis 550-fach (Co-Kultivierung mit *C. albicans* ATCC MYA-2876) höheren Freisetzung an IL-6. Diese ist nach 48 h nochmals höher (Abbildung 3-22 b).

Bei den nicht-infizierten, als auch bei den mit *C. albicans*-infizierten HaCaT-Keratinocyten sind mit steigender AC-Konzentration zunehmende Mengen an freigesetztem IL-8 zu beobachten (Abbildung 3-22 c). Nach 24-stündiger Inkubation der humanen Zellen mit AC-EDA<sub>0,45</sub> und *C. albicans* ATCC MYA-2876 werden im Vergleich zu den nicht-infizierten bzw. bei den mit *C. albicans* DSM 1386-infizierten HaCaT-Keratinocyten ab einer AC-Konzentration von 39 µg/ml größere Menge an IL-8 ausgeschüttet. Nach 48-stündiger Inkubation ist bei AC-Konzentrationen von 625 µg/ml und 2500 µg/ml eine erhöhte Ausschüttung an IL-8 bei Co-Kulturmodellen mit *C. albicans* DSM 1386 erkennbar.

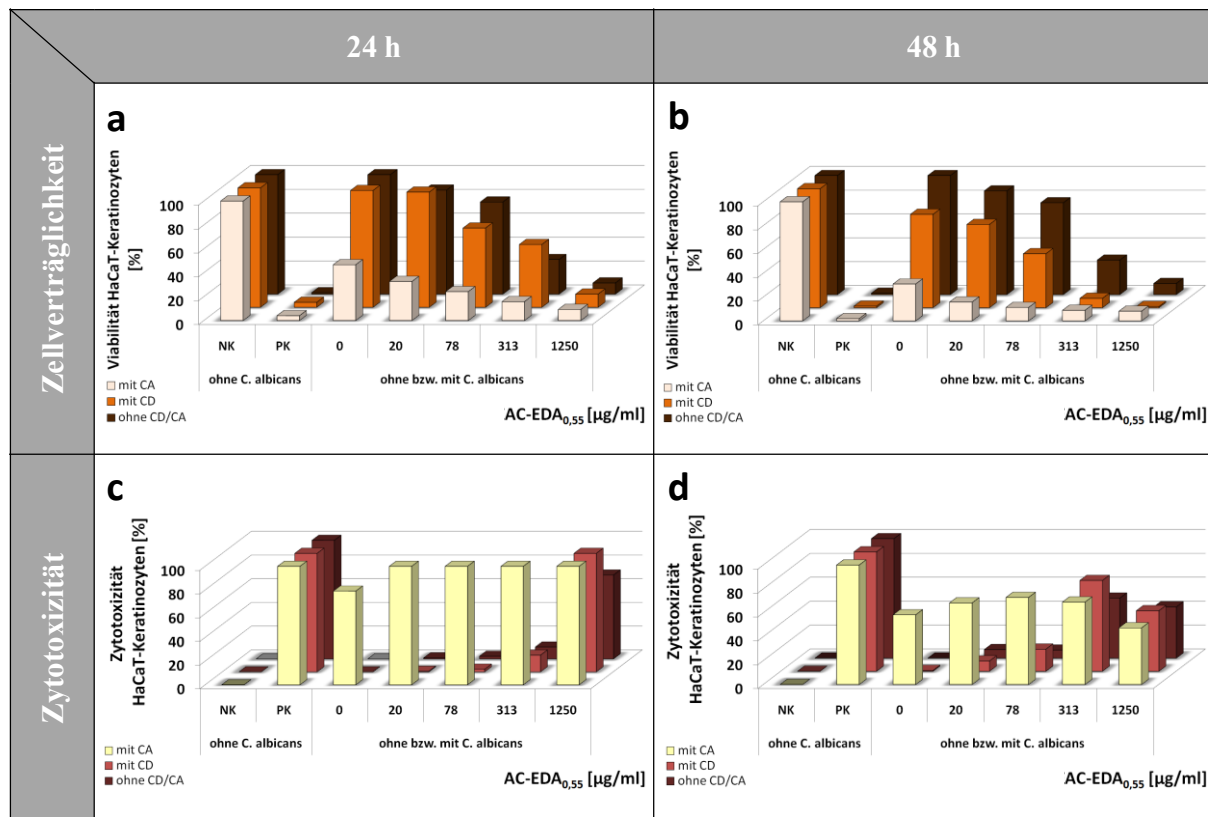
Eine Zunahme der Ausschüttung von IL1-α ist insbesondere bei den Co-Kulturmodellen mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 nachweisbar, dabei sind die Werte nach 48 h höher, als im Vergleich zu den Werten nach 24 h Co-Kultivierung und Behandlung mit AC (Abbildung 3-22 e und f). Im Fall der mit *C. albicans* DSM 1386-infizierten HaCaT-Keratinocyten entspricht die Menge an freigesetztem IL1-α nach 48 h bei einer AC-Konzentration von 2500 µg/ml der Menge an IL1-α der Positiv-Kontrolle (ca. 24 pg pro 10.000 Zellen, Abbildung 3-22 f).



**ABBILDUNG 3-22** Freisetzung der Interleukine IL-6 (a und b), IL-8 (c und d) und IL-1α (e und f) infolge der Inkubation von AC-EDA<sub>0,45</sub> im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts).

Bei der Behandlung der Co-Kulturmodelle mit AC-EDA<sub>0,55</sub> zeigt sich mit zunehmender AC-Konzentration eine Abnahme der Zellviabilität (Abbildung 3-23 a und b). Bei dem Kontrollmodell, welches nicht mit dem Hefepilz infiziert wurde, zeigt sich ab einer AC-Konzentration von 313 μg/ml nach 24 h und 48 h ein Rückgang der Zellviabilität um nahezu 70 %. Wurden die HaCaT-Keratinocyten mit dem *C. albicans*-Stamm DSM 1386 co-kultiviert, so sind nach 48 h bei einer AC-Konzentration von 313 μg/ml nur 10 % der HaCaT-Keratinocyten lebend. Bei der Co-Kultivierung der humanen Zellen mit dem invasiv-wachsenden *C. albicans*-Stamm ATCC MYA-2876 und einer AC-EDA<sub>0,55</sub>-Konzentration von 20 μg/ml ist eine Abnahme der Zellviabilität um 67 % erkennbar. Demensprechend zeigt sich bei diesem Co-Kulturmodell eine zytotoxische Wirkung bereits bei niedrigen AC-Konzentrationen, wobei bei dem anderen untersuchten Co-Kulturmodell erst eine AC-

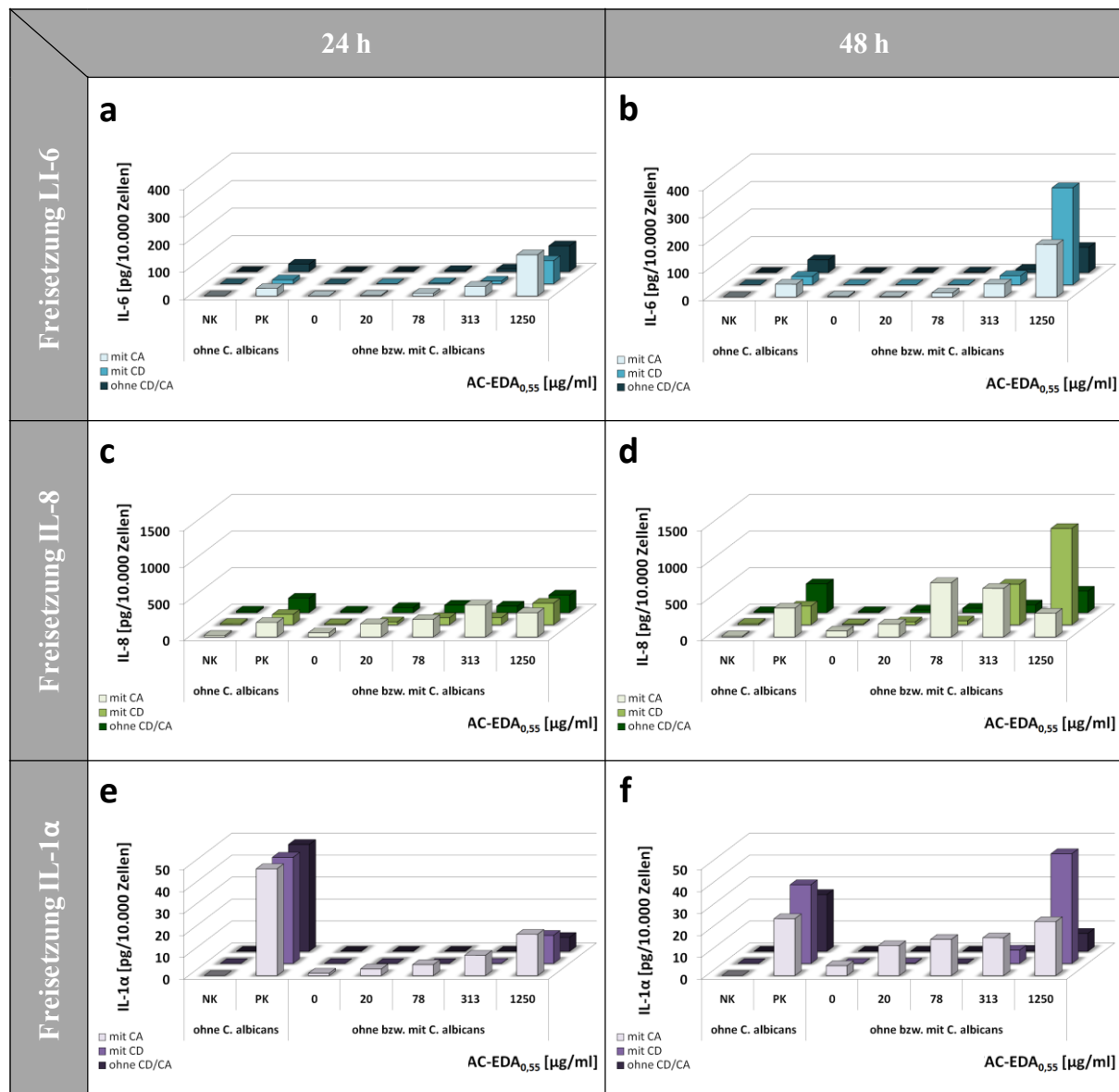
Konzentration von 313 µg/ml (48-stündige Inkubation) bzw. 1250 µg/ml (24-stündige Inkubation) gegenüber den HaCaT-Keratinocyten zytotoxische Effekte ausweist (Abbildung 3-23).



**ABBILDUNG 3-23** Zellverträglichkeit (a und b) und Zytotoxizität (c und d) von AC-EDA<sub>0,55</sub> auf HaCaT-Keratinocyten im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts).

Nach Inkubation der 2d-Co-Kulturmodlle mit AC-EDA<sub>0,55</sub> zeigt sich eine hohe Ausschüttung an IL-6 in das Zellkulturmedium ab einer AC-Konzentration von 313 µg/ml (Co-Kulturmodell mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 nach 24 h bzw. bei beiden Co-Kulturmodellen nach 48 h; Abbildung 3-24 a und b). Bei dem Co-Kulturmodell mit *C. albicans* DSM 1386 zeigt sich bei einer AC-Konzentration von 1250 µg/ml nach 48 h die höchste gemessene IL-6-Konzentration von rund 350 pg pro 10.000 Zellen. Bei der Freisetzung von IL-8 sind bereits ab einer AC-Konzentration von 20 µg/ml (Co-Kulturmodell mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 nach 24 h) die nachweisbaren Mengen im Bereich der Werte für die Positiv-Kontrolle (rund 200 pg pro 10.000 Zellen) und nehmen mit zunehmender AC-Konzentration ebenfalls zu (Abbildung 3-24 c). Ähnlich zur Auffälligkeit der hohen IL-6-Konzentration nach 48 h im Co-Kulturmodell mit *C. albicans* DSM 1386, zeigt sich auch für IL-8 nach dieser Inkubationszeit dieses Co-Kulturmodells der höchste gemessene Wert (Abbildung 3-24 d). Diese Beobachtung zeigt sich auch bei der Betrachtung der IL-1α-Freisetzung (Abbildung 3-24 f). Zudem ist insbesondere für das Co-Kulturmodell mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die ausgeschütteten Mengen an IL-1α erkennbar. Mit steigender AC-Konzentration nimmt die Menge an nachweisbarem IL-1α zu (Abbildung 3-24 e).

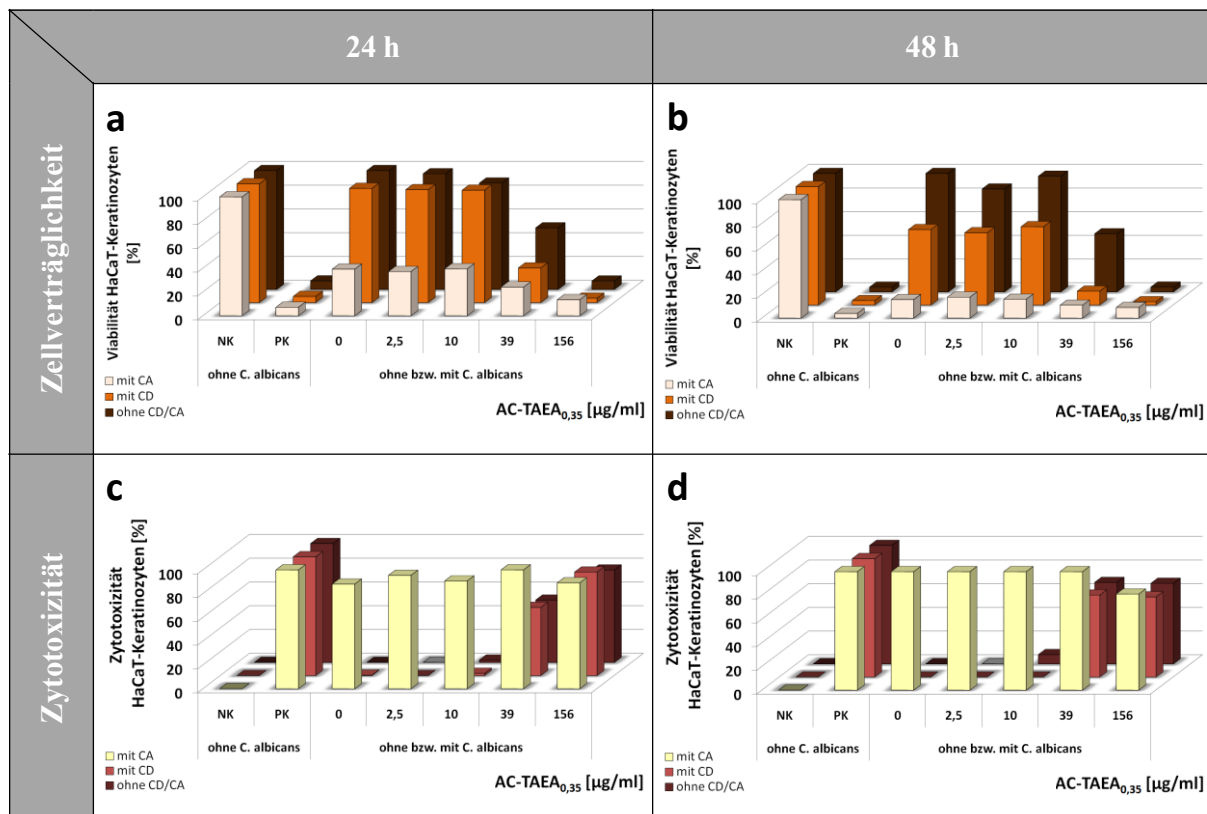




**ABBILDUNG 3-24** Freisetzung der Interleukine IL-6 (a und b), IL-8 (c und d) und IL-1α (e und f) infolge der Inkubation von AC-EDA<sub>0,55</sub> im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts).

Die Infektion der HaCaT-Keratinocyten mit *C. albicans* DSM 1386 zeigt nach der Behandlung mit AC-TAEA<sub>0,35</sub> hinsichtlich Viabilität und Zytotoxizität kaum Unterschiede zu den nicht infizierten und ebenfalls mit AC-TAEA<sub>0,35</sub>-behandelten HaCaT-Keratinocyten (Abbildung 3-25 a-d). Ab einer AC-Konzentration von 39 µg/ml ist im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle eine stärkere Abnahme in der Zellviabilität auf 29 % (24 h) bzw. auf 13 % (48 h) zu erkennen (Abbildung 3-25 a und b). Bei dem Co-Kulturmodell mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 zeigen sich im Vergleich zum Kontrollmodell deutlichere Unterschiede hinsichtlich Zellviabilität und Zytotoxizität. Nach 24 h zeigt sich bei dem *C. albicans* ATCC MYA-2876-infizierten Co-Kulturmodell bereits bei niedrigen AC-Konzentrationen ein hohes zytotoxisches Potential (Abbildung 3-25 c).



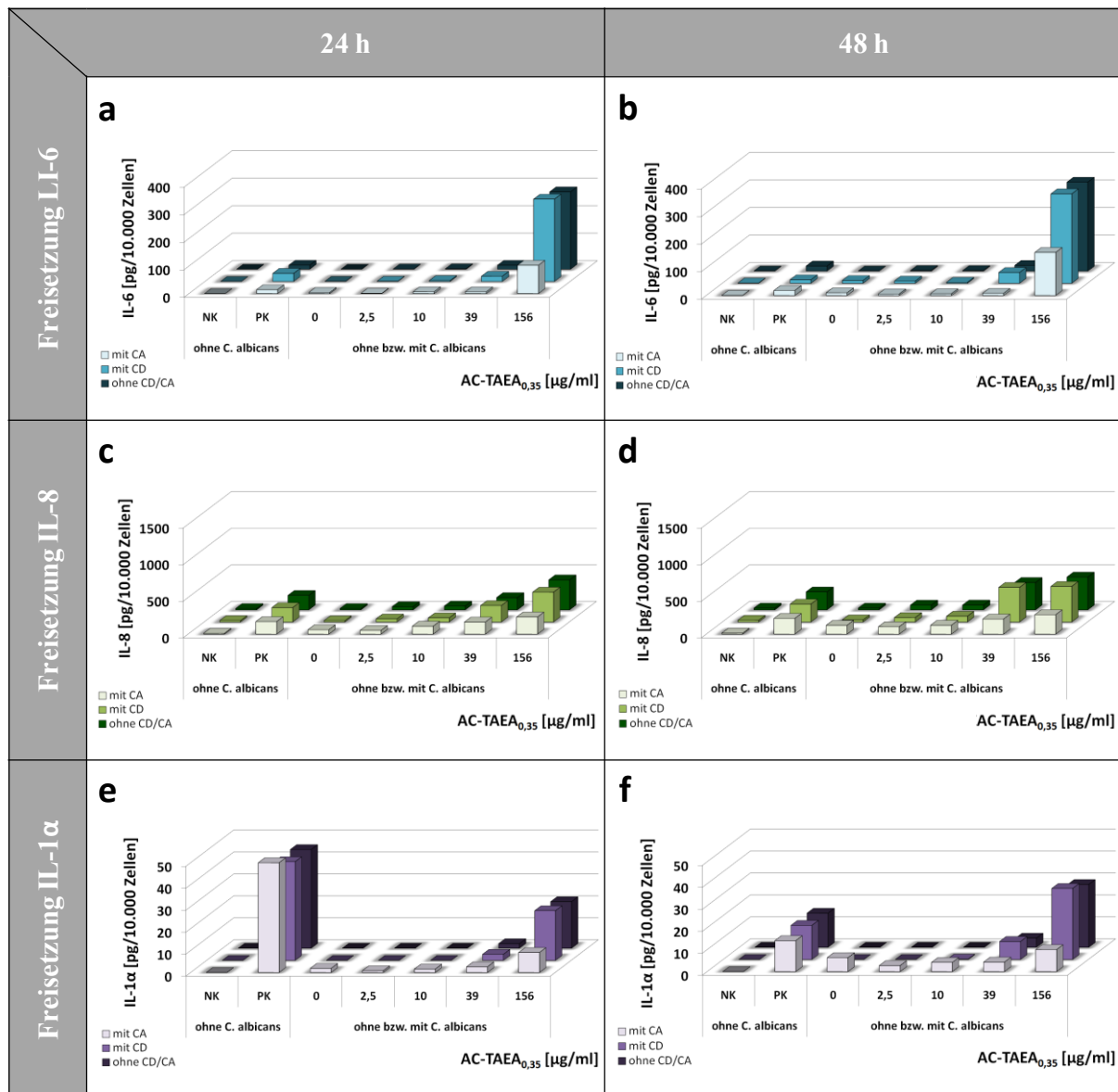


**ABBILDUNG 3-25** Zellverträglichkeit (a und b) und Zytotoxizität (c und d) von AC-TAEA<sub>0,35</sub> auf HaCaT-Keratinocyten im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts).

Die Ergebnisse der immunologischen Analyse zeigen bei der höchsten AC-TAEA<sub>0,35</sub>-Konzentration große Mengen an freigesetztem IL-6. Dabei sind die freigesetzten Mengen in dem Co-Kulturmodell mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 um das 3-fache (24 h) bzw. 1,5-fache (48 h) niedriger als bei dem nicht-infizierten oder dem mit *C. albicans* DSM 1386-infizierten Co-Kulturmodell (Abbildung 3-26 a und b).

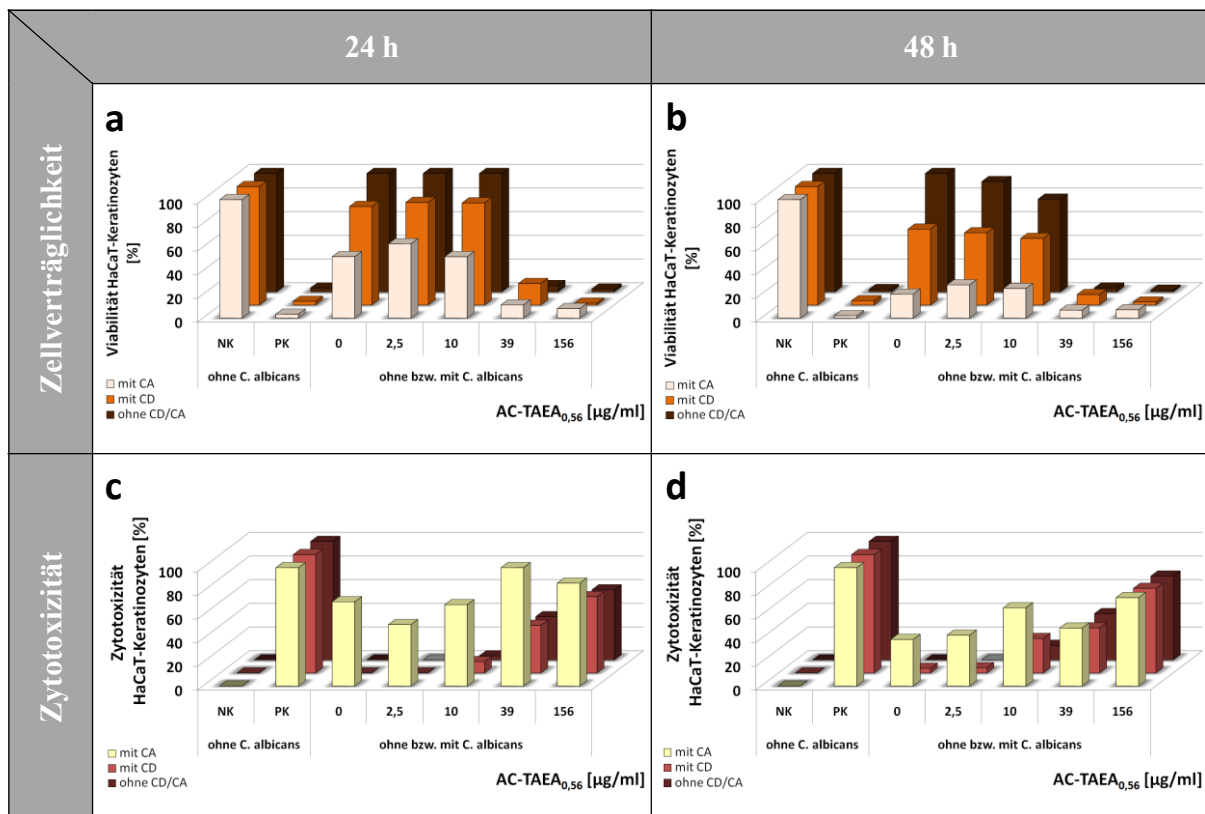
Anhand der freigesetzten Mengen an IL-8 sind bei den Co-Kulturmodellen nach 24 h und 48 h ab einer AC-Konzentration von 39 µg/ml Zunahmen in der Interleukin-Freisetzung zu erkennen (Abbildung 3-26 c und d).

Bei der IL-1 $\alpha$ -Freisetzung zeigen sich ähnliche Ergebnisse, wie bei der Freisetzung von IL-6. Es sind große Mengen an IL-1 $\alpha$  infolge der Behandlung der Co-Kulturmodelle mit der höchsten AC-Konzentration nachweisbar. Auch hier zeigt sich, dass bei den mit *C. albicans* ATCC MYA-2876-infizierten HaCaT-Keratinocyten die freigesetzten IL-1 $\alpha$ -Mengen geringer sind, als bei dem Co-Kulturmodell mit *C. albicans* DSM 1386 bzw. bei den nicht-infizierten HaCaT-Keratinocyten (Abbildung 3-26 e und f).



**ABBILDUNG 3-26** Freisetzung der Interleukine IL-6 (a und b), IL-8 (c und d) und IL-1α ( e und f) infolge der Inkubation von AC- TAEA<sub>0,35</sub> im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts).

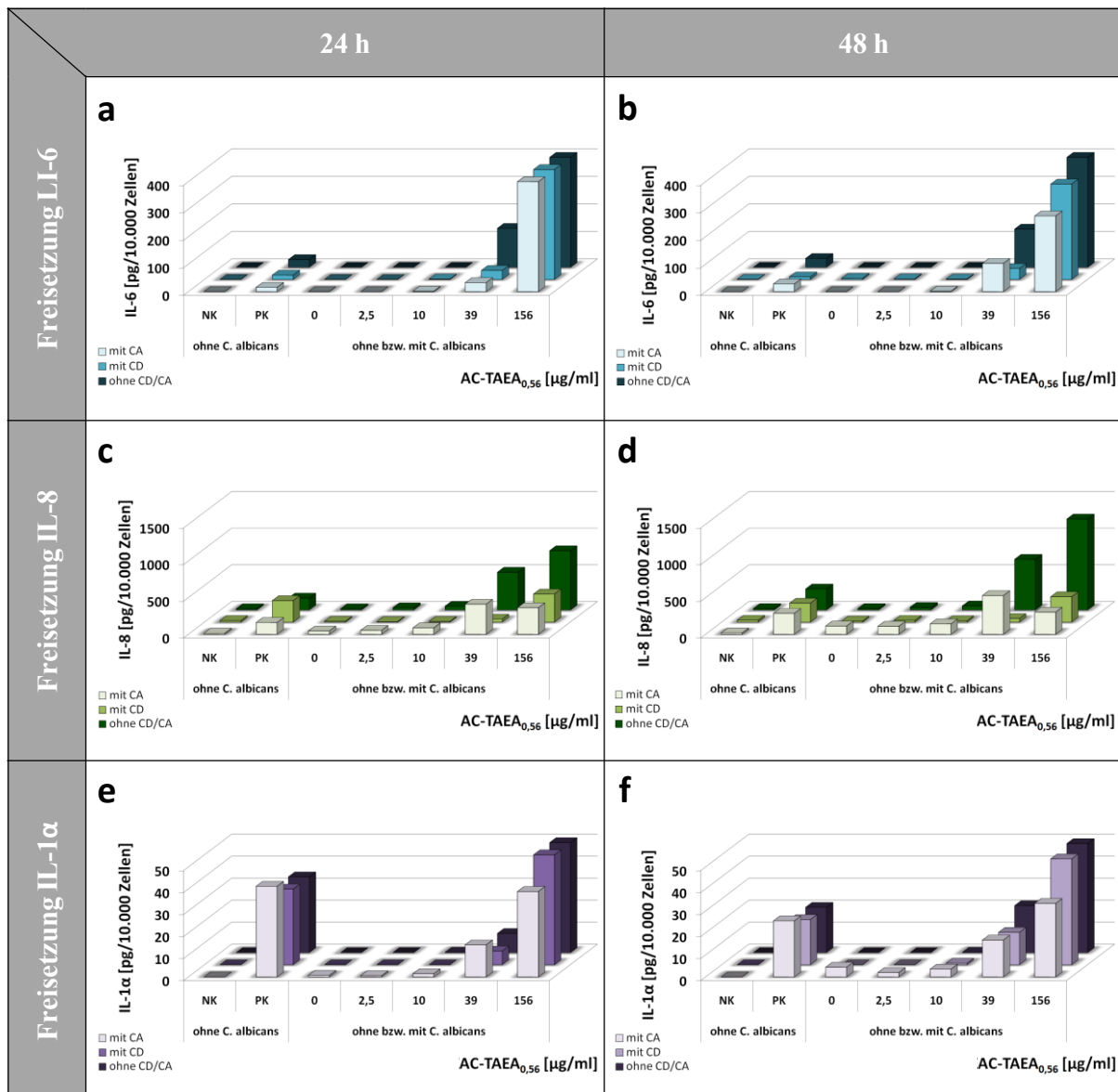
Bei den Co-Kulturmodellen, welche mit AC-TAEA<sub>0,56</sub> behandelt wurden, zeigen sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Kulturmodellen. Zum Beispiel nimmt die Viabilität der mit *C. albicans* DSM 1386-infizierten HaCaT-Keratinocyten im Vergleich zu den nicht-infizierten humanen Zellen bei niedrigen AC-Konzentrationen im Durchschnitt um 20 % (24 h) bzw. um 40 % (48 h) ab (Abbildung 3-27 a und b). Bei den Co-Kulturmodellen mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 ist die Viabilität der HaCaT-Keratinocyten im Vergleich zu den Co-Kulturmodellen mit *C. albicans* DSM 1386 geringer. Es zeigt sich für dieses Co-Kulturmodell ein hohes zytotoxisches Potential bei niedrigen AC-TAEA<sub>0,56</sub>-Konzentrationen. Im Vergleich dazu zeigen sich bei *C. albicans* DSM 1386-infizierten HaCaT-Keratinocyten ab einer AC-Konzentration von 39 µg/ml nach 24 h zytotoxische Wirkungen auf die humanen Zellen (Abbildung 3-27 c).



**ABBILDUNG 3-27** Zellverträglichkeit (a und b) und Zytotoxizität (c und d) von AC-TAEA<sub>0,56</sub> auf HaCaT-Keratinocyten im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts).

Anhand der ELISA-Ergebnisse ist eine erhöhte Ausschüttung an IL-6 (im Bereich von 600 pg pro 10.000 Zellen) bei einer AC-Konzentration von 156 µg/ml zu beobachten (Abbildung 3-28 a). Bei den nicht mit *C. albicans*-infizierten HaCaT-Keratinocyten ist bereits nach 24 h bei einer AC-Konzentration von 39 µg/ml eine erhöhte Freisetzung des Interleukins mit ca. 140 pg pro 10.00 Zellen zu erkennen.

Die Ergebnisse der Freisetzung an IL-8 und IL-1α zeigen nach 24-stündiger Behandlung mit AC-TAEA<sub>0,56</sub> ab 39 µg/ml, dass große Mengen an Interleukinen ausgeschüttet werden (Abbildung 3-28 c-f). Insbesondere bei der Freisetzung von IL-1α nach 24 h sind im Vergleich zwischen den AC-Konzentrationen 39 µg/ml und 156 µg/ml bis zu 10-fach höhere Interleukin-Konzentrationen nachweisbar (Abbildung 3-28 e).



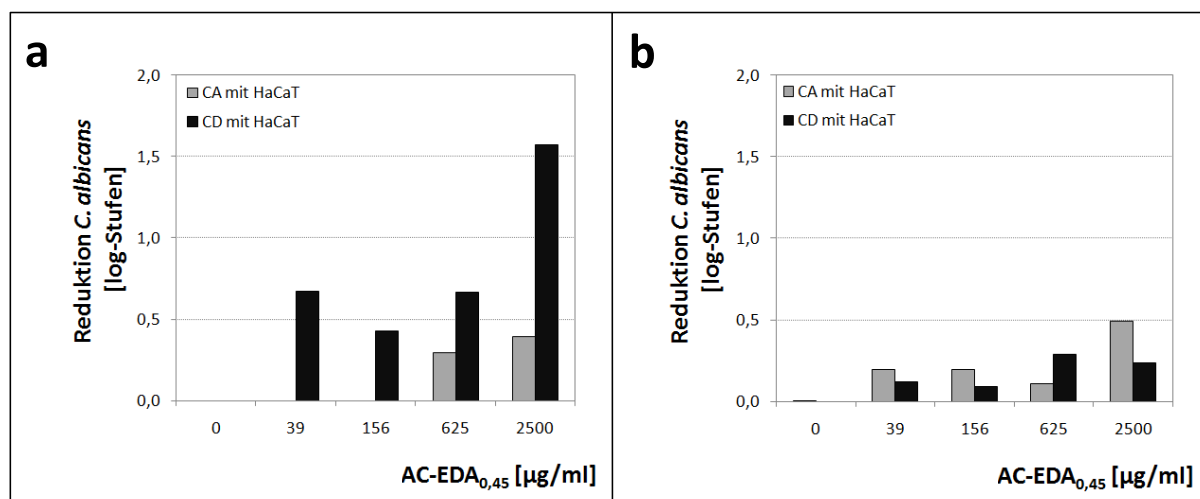
**ABBILDUNG 3-28** Freisetzung der Interleukine IL-6 (a und b), IL-8 (c und d) und IL-1α (e und f) infolge der Inkubation von AC-TAEA<sub>0,56</sub> im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts).

### 3.6.2 Quantifizierung von *C. albicans* im 2d-Co-Kulturmodell

Die Quantifizierung von *C. albicans* in den mit AC-behandelten 2d-Co-Kulturmodellen erfolgte mittels qPCR anhand eines spezifischen Primerpaars. Hierzu wurde nach der Co-Kultivierung mikrobielle gDNA isoliert und für die qPCR aufbereitet.

Die Ergebnisse der qPCR zeigen bei der Co-Kultivierung der HaCaT-Keratinocyten mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 nach 24-stündiger Behandlung mit AC-EDA<sub>0,45</sub> eine maximale Reduktion der mikrobiellen Zellen um 0,4 log-Stufen bei einer AC-Konzentration von 2500 µg/ml (Abbildung 3-29 a). Nach 48-stündiger Inkubation wird bei dieser AC-Konzentration eine Reduktion von *C. albicans* ATCC MYA-2876 um 0,5 log-Stufen erreicht (Abbildung 3-29 b).

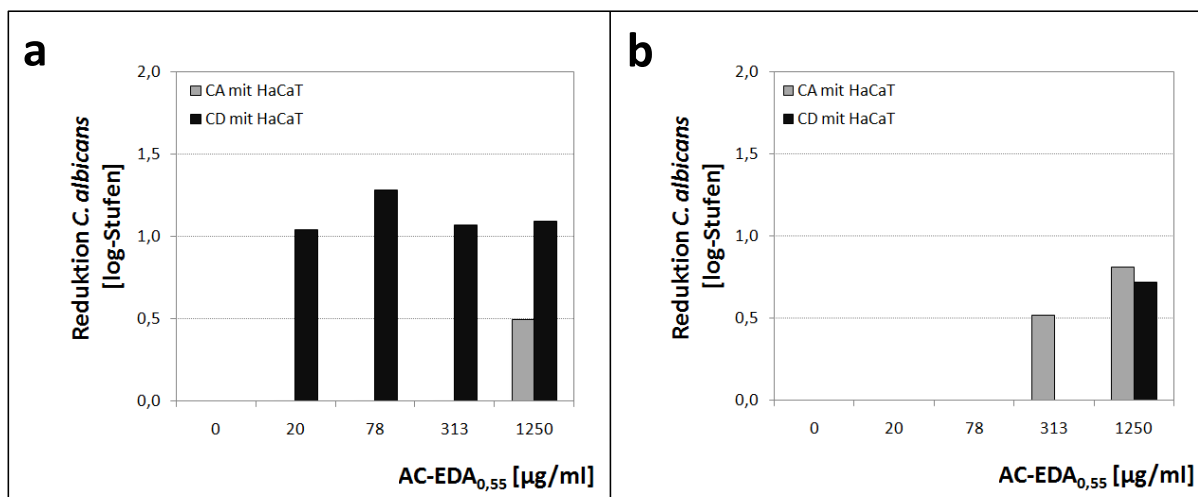
Für den DSM-Stamm zeigt sich nach 24-stündiger Inkubation eine maximale Reduktion um 1,6 log-Stufen (Abbildung 3-29 a). Im Gegensatz zu dem Co-Kulturmodell mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 ist nach 24-stündiger Inkubation bei jeder AC-Konzentration eine Abnahme des mikrobiellen Wachstums von *C. albicans* DSM 1386 um mindestens 0,4 log-Stufen zu erkennen (Abbildung 3-29 a). Im Vergleich dazu wird nach 48-stündiger Behandlung der Co-Kulturmodelle mit AC-EDA<sub>0,45</sub> das Wachstum von *C. albicans* DSM 1386 um maximal 0,3 log-Stufen reduziert (Abbildung 3-29 b).



**ABBILDUNG 3-29** Die Quantifizierung der beiden *C. albicans*-Stämme DSM 1386 (CD) und ATCC MYA-2876 (CA) in den Co-Kulturmodellen erfolgte mittels qPCR. Die Reduktion der mikrobiellen Zellen nach 24- (a) und 48-stündiger (b) Inkubation im Co-Kulturmodell mit HaCaT-Keratinocyten und AC-EDA<sub>0,45</sub> wird in log-Stufen angegeben.

Bei den Co-Kulturmodellen mit *C. albicans* ATCC MYA-2876, welche mit AC-EDA<sub>0,55</sub> behandelt wurden, zeigt sich nach 24 h nur bei der höchsten AC-Konzentration eine Reduktion der mikrobiellen Zellen um 0,5 log-Stufen (Abbildung 3-30 a). Dieser Wert wird ebenfalls nach 48-stündiger Inkubation bei einer AC-Konzentration von 313 µg/ml erreicht und erhöht sich bei einer AC-Konzentration von 1250 µg/ml auf 0,8 log-Stufen (Abbildung 3-30 b).

Für *C. albicans* DSM 1386 ist nach 24-stündiger Behandlung in den Co-Kulturmodelle mit AC-EDA<sub>0,55</sub> vergleichsweise eine stärkere Reduktion des mikrobiellen Wachstums zu erkennen. Hierbei wird eine maximale Reduktion von *C. albicans* DSM 1386 um 1,3 log-Stufen erreicht (Abbildung 3-30 a). Nach 48 h ist nur bei der höchsten AC-Konzentration eine Minderung der Hefezellen um 0,7 log-Stufen (Abbildung 3-30 b) zu beobachten.

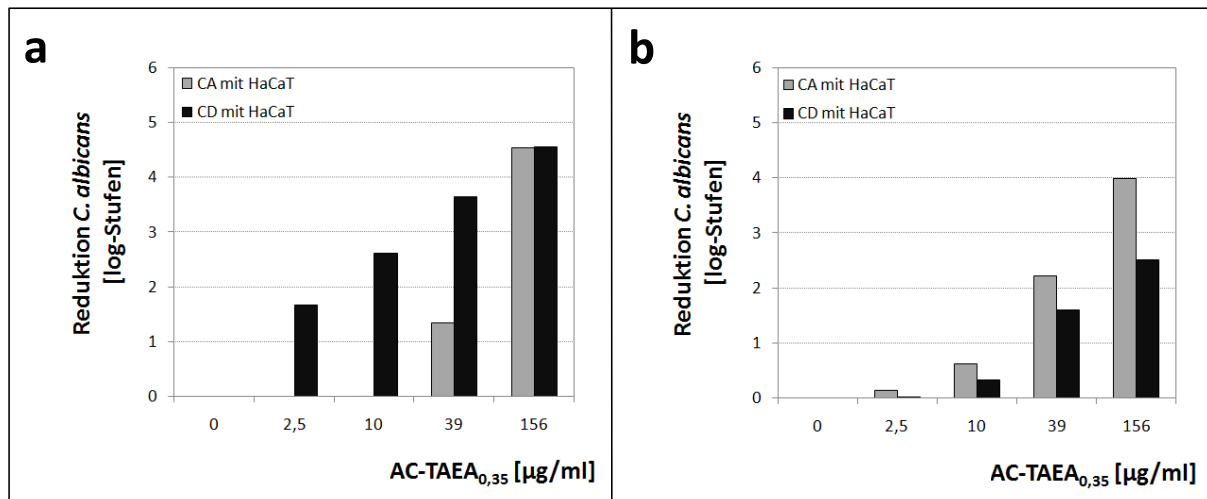


**ABBILDUNG 3-30** Die Quantifizierung der beiden *C. albicans*-Stämme DSM 1386 (CD) und ATCC MYA-2876 (CA) in den Co-Kulturmodellen erfolgte mittels qPCR. Die Reduktion der mikrobiellen Zellen nach 24- (a) und 48-stündiger (b) Inkubation im Co-Kulturmodell mit HaCaT-Keratinocyten und AC-EDA<sub>0,55</sub> wird in log-Stufen angegeben.

Anhand der Quantifizierung von *C. albicans* in den Co-Kulturmodellen mittels qPCR ist eine konzentrationsabhängige Reduktion beider *Candida*-Stämme nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit AC-TAEA<sub>0,35</sub> zu erkennen (Abbildung 3-31 a und b).

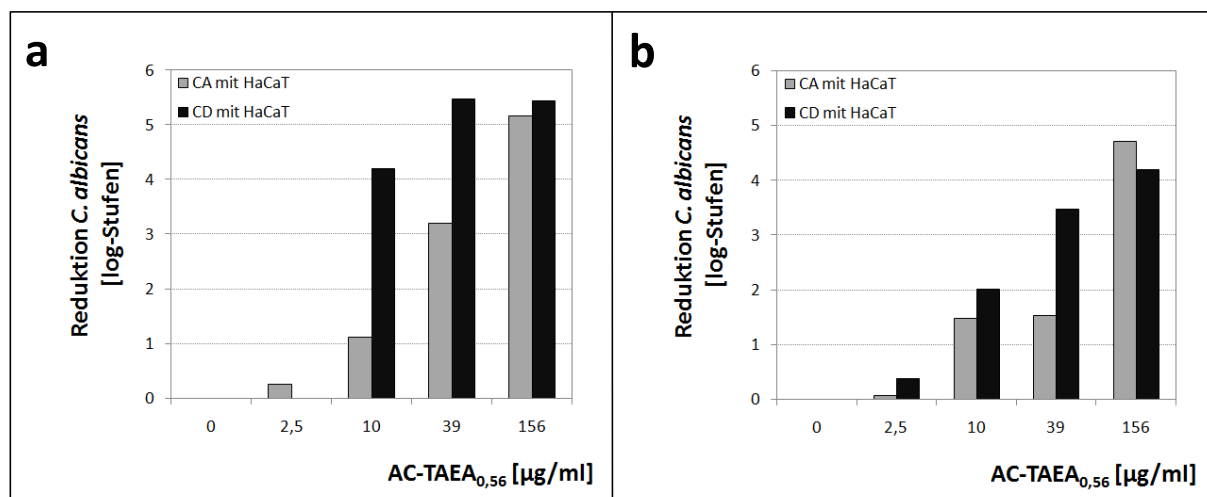
Bei den Co-Kulturmodellen mit *C. albicans* DSM 1386 beträgt die Reduktion der mikrobiellen Zellen nach 24-stündiger Inkubation bei einer AC-Konzentration von 2,5 µg/ml 1,8 log-Stufen. Mit steigender AC-Konzentration nimmt auch die Anzahl der Hefezellen ab und erreicht bei der höchsten AC-Konzentration eine maximale Reduktion um 4,5 log-Stufen (Abbildung 3-31 a). Nach 48-stündiger Inkubation werden maximal 2,2 log-Stufen erreicht (Abbildung 3-31 b).

Bei *C. albicans* ATCC MYA-2876 ist nach 24 h erst ab einer AC-Konzentration von 39 µg/ml ein Rückgang der Hefezellen erkennbar und erreicht bei der höchsten AC-Konzentration einen Wert von 4,5 log-Stufen (Abbildung 3-31 a). Nach 48 h wird bei der höchsten AC-Konzentration eine maximale Reduktion der mikrobiellen Zellen von 4 log-Stufen erreicht (Abbildung 3-31 b).



**ABBILDUNG 3-31** Die Quantifizierung der beiden *C. albicans*-Stämme DSM 1386 (CD) und ATCC MYA-2876 (CA) in den Co-Kulturmodellen erfolgte mittels qPCR. Die Reduktion der mikrobiellen Zellen nach 24- (a) und 48-stündiger (b) Inkubation im Co-Kulturmodell mit HaCaT-Keratinocyten und AC-TAEA<sub>0,35</sub> wird in log-Stufen angegeben.

Im Vergleich zur Behandlung der Co-Kulturmodelle mit AC-TAEA<sub>0,35</sub> zeigt sich auch bei der Behandlung der Co-Kulturmodelle mit AC-TAEA<sub>0,56</sub> eine konzentrationsabhängige Reduktion beider *Candida*-Stämme nach 24 h und 48 h (Abbildung 3-32 a und b). Mit zunehmender AC-Konzentration ist eine stärkere Reduktion der mikrobiellen Zellen anhand der qPCR-Ergebnisse zu erkennen. Mit AC-TAEA<sub>0,56</sub> kann *C. albicans* DSM 1386 um maximal 5,5 log-Stufen (Abbildung 3-32 a) und nach 48 h um maximal 4,1 log-Stufen (Abbildung 3-32 b) in den Co-Kulturmodellen reduziert werden. Für *C. albicans* ATCC MYA-2876 werden maximale Werte von 5,1 log-Stufen (Abbildung 3-32 a) bzw. 4,8 log-Stufen (Abbildung 3-32 b) mittels qPCR bestimmt.



**ABBILDUNG 3-32** Die Quantifizierung der beiden *C. albicans*-Stämme DSM 1386 (CD) und ATCC MYA-2876 (CA) in den Co-Kulturmodellen erfolgte mittels qPCR. Die Reduktion der mikrobiellen Zellen nach 24- (a) und 48-stündiger (b) Inkubation im Co-Kulturmodell mit HaCaT-Keratinocyten und AC-TAEA<sub>0,56</sub> wird in log-Stufen angegeben.

### 3.7 Biokompatibilitätsindex der AC

Zum Vergleich der Biokompatibilität und der Biofunktionalität von AC wurde ein BI definiert. Der BI wird anhand des Verhältnisses von  $LC_{50}$  zu  $IC_{50}$  der jeweiligen AC berechnet (siehe Formel 1-1, Seite 11). Die  $IC_{50}$ - als auch  $LC_{50}$ -Werte wurden bereits in den Abschnitten 3.4.1 und 3.5.2 präsentiert. In diesem Abschnitt werden diese Werte zum jeweiligen BI für die AC nach einer 24-stündigen Inkubation zusammengefasst und liefern Auskünfte über die Biokompatibilität und Biofunktionalität der AC.

Wie bereits erwähnt, weisen Substanzen mit einem  $BI > 1$  eine hohe antimikrobielle Wirksamkeit neben einer hohen Zellverträglichkeit auf. Bei einem  $BI < 1$  ist zwar eine antimikrobielle Wirkung vorhanden, jedoch keine Zellverträglichkeit.

In Tabelle 3-4 sind die berechneten BI für die jeweiligen AC zusammengefasst. Für AC mit EDA-Funktionalisierung berechnen sich BI von 4,01 ( $DS = 0,45$ ) und 2,61 ( $DS = 0,55$ ). Hierbei ist der BI für AC mit niedrigerem DS um das Anderthalbfache höher, als für AC mit gleicher Funktionalisierung, aber höherem DS. Dies lässt sich auch für AC mit TAEA als funktioneller Gruppe erkennen, jedoch liegen die BI für diese AC unterhalb des Wertes 1.

Zusammenfassend lässt sich bemerken, dass AC mit EDA als funktioneller Gruppe biokompatibel sind. Für AC mit TAEA als funktioneller Gruppe trifft diese Aussage nicht zu.

**TABELLE 3-4** Zusammenfassung der ermittelten  $LC_{50}$ - und  $IC_{50}$ -Werte für die jeweiligen AC zu einem Biokompatibilitätsindex (BI).

	AC-EDA <sub>0,45</sub>	AC-EDA <sub>0,55</sub>	AC-TAEA <sub>0,35</sub>	AC-TAEA <sub>0,56</sub>
$LC_{50}$	2758,6 µg/ml	1378,4 µg/ml	36,6 µg/ml	26,2 µg/ml
$IC_{50}$	687,7 µg/ml	528,24 µg/ml	269,9 µg/ml	374,3 µg/ml
<b>BI</b>	<b>4,01</b>	<b>2,61</b>	<b>0,14</b>	<b>0,07</b>

### 3.8 Verträglichkeit der AC in 3d-Hautmodellen

Die Verträglichkeit der AC wurde neben dem 2d-HaCaT-Keratinocytenmodell auch an 3d-Hautmodellen untersucht. Diese Hautmodelle bestehen aus einer Epidermis mit Keratinocyten und einer Dermis mit Fibroblasten, welche in eine Kollagenmatrix eingebettet sind.

Die Hautmodelle wurden mit den jeweiligen Stammlösungen der AC (Konzentration von 10 mg/ml) für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Zudem wurden die 3d-Hautmodelle, analog zu den 2d-Co-Kulturmodellen, mit einem invasiv-wachsenden und einem nicht-invasiv-wachsenden *C. albicans*-Stamm inkubiert und anschließend mit den jeweiligen Stammlösungen der AC für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurden 3d-Hautmodelle mit PBS inkubiert. PBS hat hierbei keinen Einfluss auf die Zellen innerhalb des Hautmodells und daher dienen diese als unbehandelte Modelle.

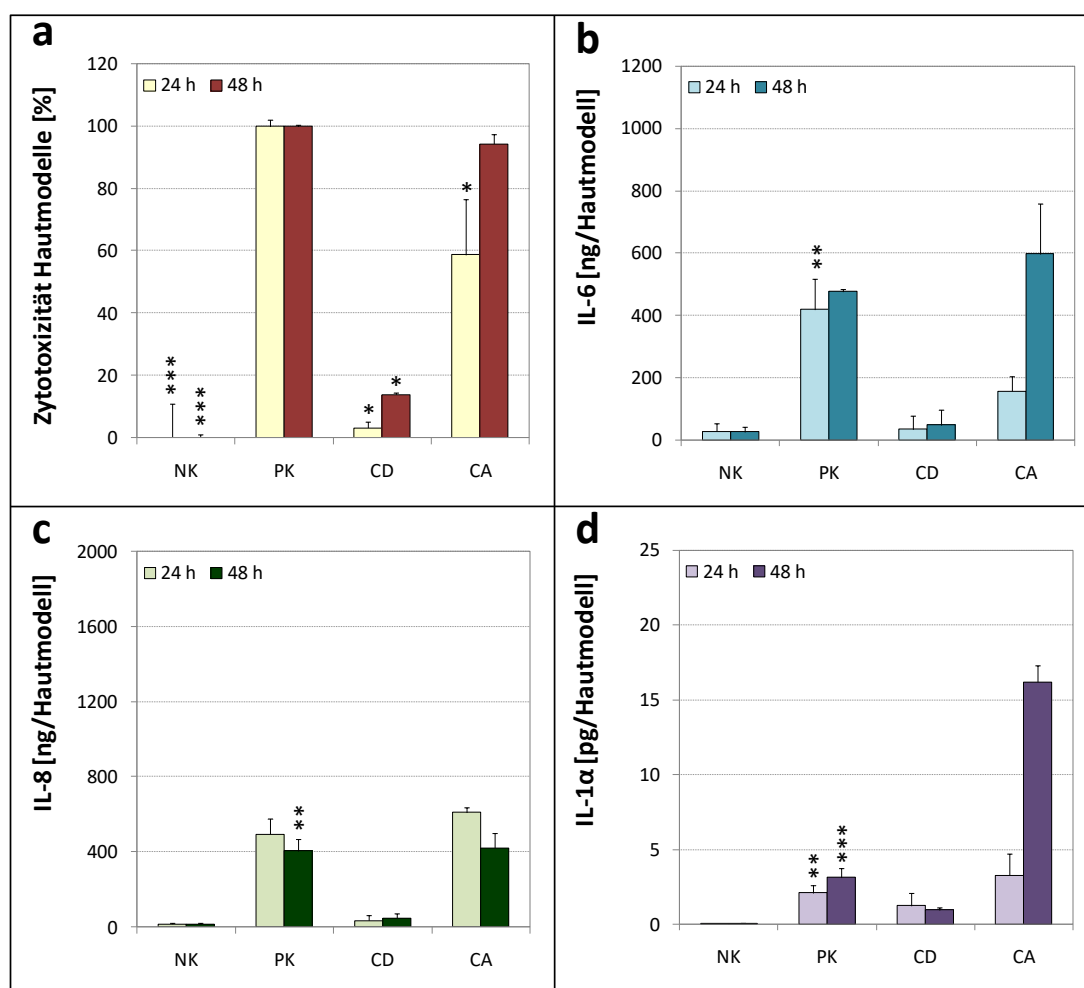


Um einen Vergleich zu einem geschädigten Hautmodell zu haben, wurden Hautmodelle mit einer 0,5 %-igen Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS; als Positiv-Kontrolle) inkubiert.

### 3.8.1 Viabilität, Zytotoxizität und Freisetzung von Interleukinen in 3d-Hautmodellen

Die Ergebnisse der Analyse des schädigenden Potentials veranschaulichen, dass SDS zytotoxisch auf die Zellen in den Hautmodellen wirkt (Abbildung 3-33 a). Ebenso wirkt sich die Co-Kultivierung der Hautmodelle mit dem invasiv-wachsenden *C. albicans* Stamm ATCC MYA-2876 negativ auf die Viabilität der Zellen aus. So beträgt das zytotoxische Potential nach 24 h rund 60 % und erreicht nach 48 h nahezu 95 % (Abbildung 3-33 a). Im Gegensatz dazu geht von *C. albicans* DSM 1386 kein (24 h) bzw. ein geringes toxisches Potential von 14 % (48 h) aus.

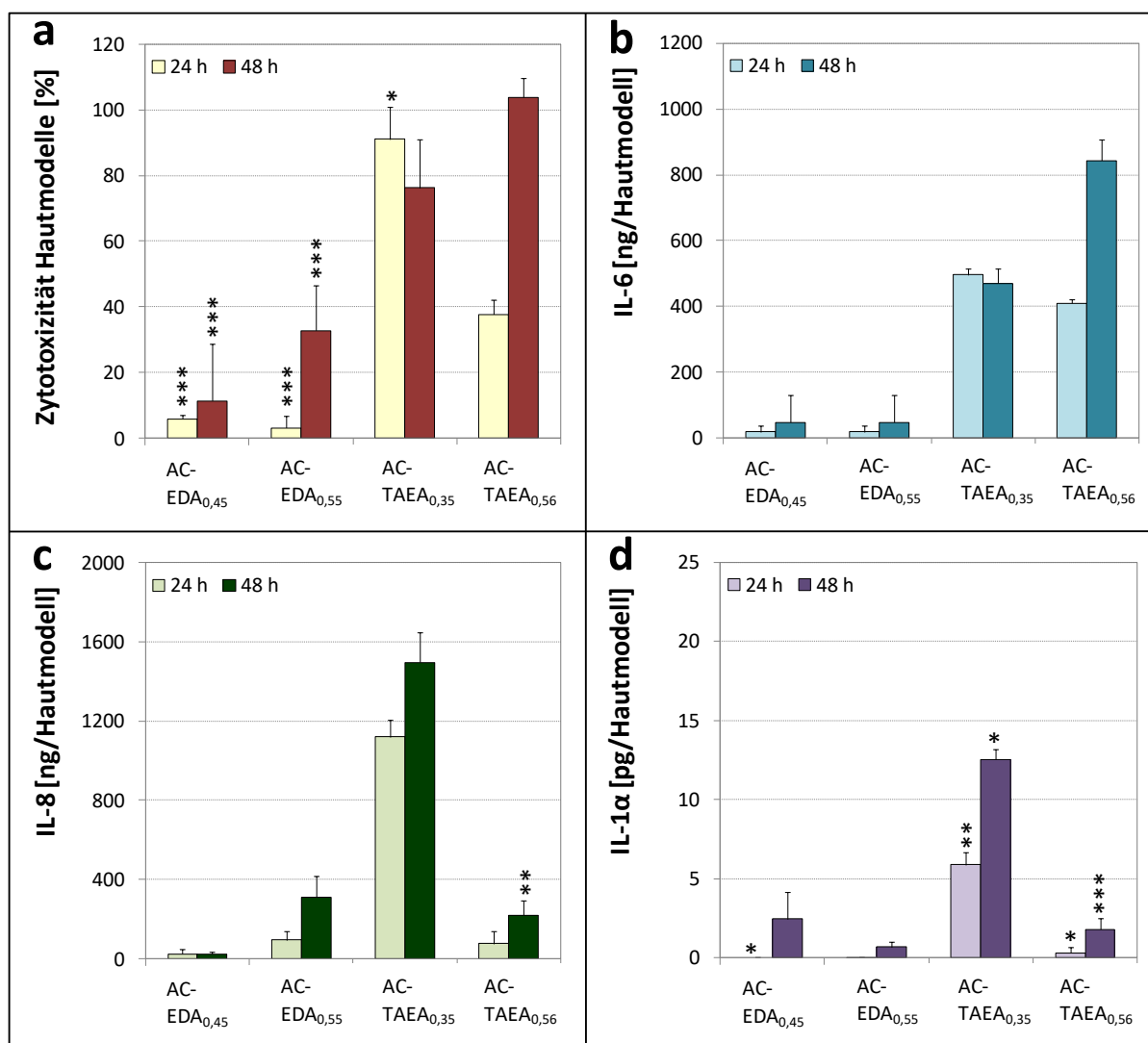
Die Analyse der Interleukin-Ausschüttung mittels ELISA zeigt nach der Inkubation der Hautmodelle mit der Positiv-Kontrolle, als auch mit *C. albicans* ATCC MYA-2876, große Freisetzungsmengen an IL-6 (Abbildung 3-33 b), IL-8 (Abbildung 3-33 c) und IL-1 $\alpha$  (Abbildung 3-33 d).



**ABBILDUNG 3-33** Analyse des zytotoxischen Potentials (a) und der Freisetzung der Interleukine IL-6 (b), IL-8 (c) und IL-1 $\alpha$  (d) bei 3d-Hautmodellen nach Inkubation mit PBS (Negativ-Kontrolle, NK), 0,5 % SDS (Positiv-Kontrolle, PK) oder mit je  $1 \times 10^3$  KBE/ml *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA).

AC mit EDA-Funktionalisierung zeigen einen geringeren Einfluss auf die Viabilität der Zellen im Hautmodell, als AC mit TAEA als funktioneller Gruppe (Abbildung 3-34 a). In den meisten Fällen sind die negativen Einflüsse auf die humanen Zellen nach 48-stündiger Inkubation größer, als nach 24 h.

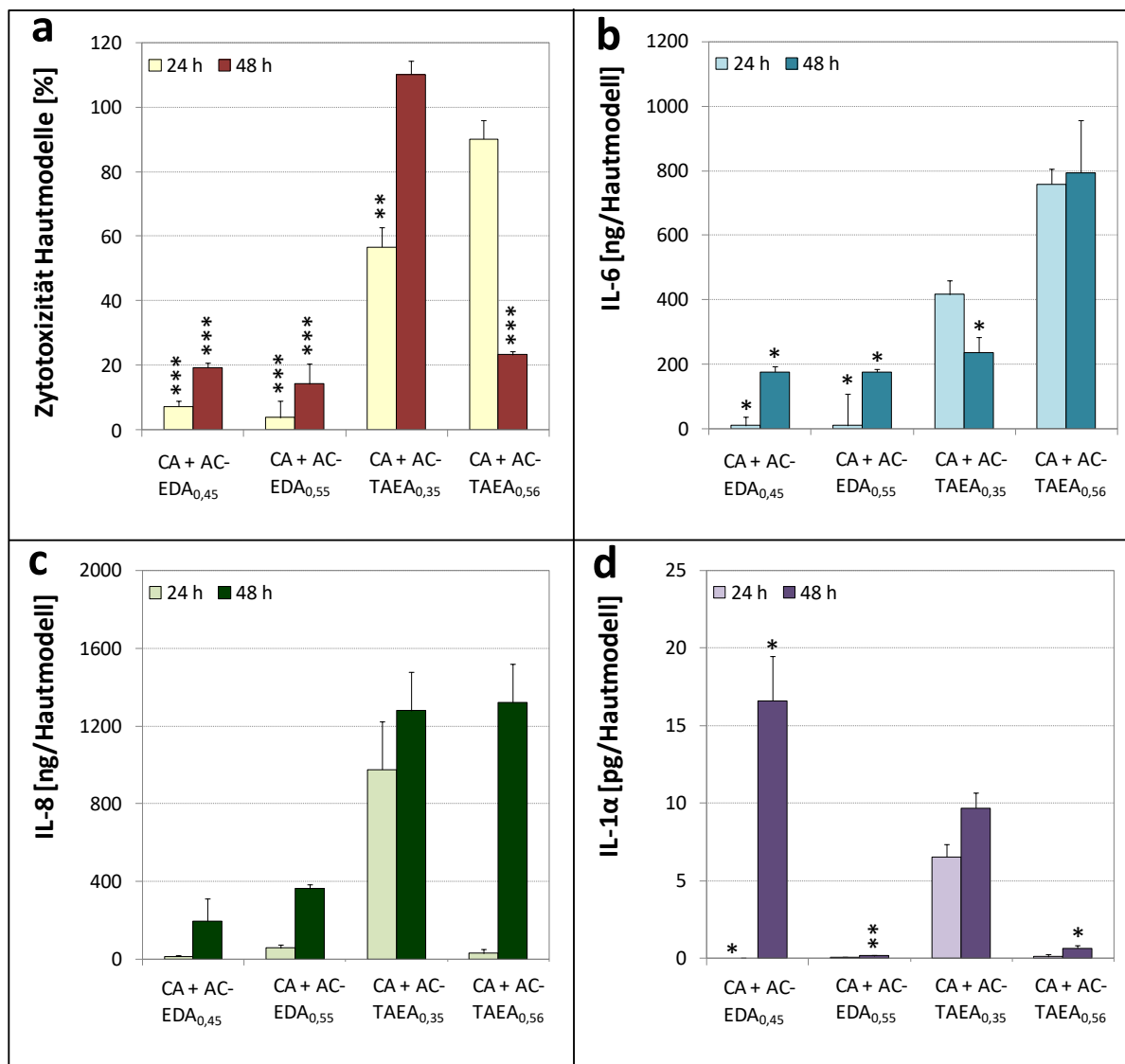
Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der Freisetzung von Interleukinen, wobei im Fall von AC-TAEA<sub>0,56</sub> nur niedrige Mengen an IL-8 und IL-1 $\alpha$  ausgeschüttet werden (Abbildung 3-34 c und d).



**ABBILDUNG 3-34** Analyse des zytotoxischen Potentials (a) und der Freisetzung der Interleukine IL-6 (b), IL-8 (c) und IL-1 $\alpha$  (d) infolge der Inkubation 3d-Hautmodelle mit unterschiedlichen AC mit einer Konzentration von je 10 mg/ml.

3d-Hautmodelle, welche mit dem invasiv-wachsenden Hefepilz infiziert wurden, zeigen ein hohes zytotoxisches Potential bei Inkubation mit TAEA-funktionalisierten AC (Abbildung 3-35). Bei Hautmodellen, welche mit diesen AC inkubiert wurden, sind im Vergleich zu AC mit EDA, insbesondere nach 48 h, größere Mengen an IL-6 und IL-8 nachweisbar (Abbildung 3-35 b und c). Im Fall der Ausschüttung von IL-1 $\alpha$  ist nach 48-stündiger Inkubation der Hautmodelle mit AC-EDA<sub>0,45</sub>

und *C. albicans* ATCC MYA-2876 mit 16,6 pg pro Hautmodell die größte Menge an IL-1 $\alpha$  nachweisbar.



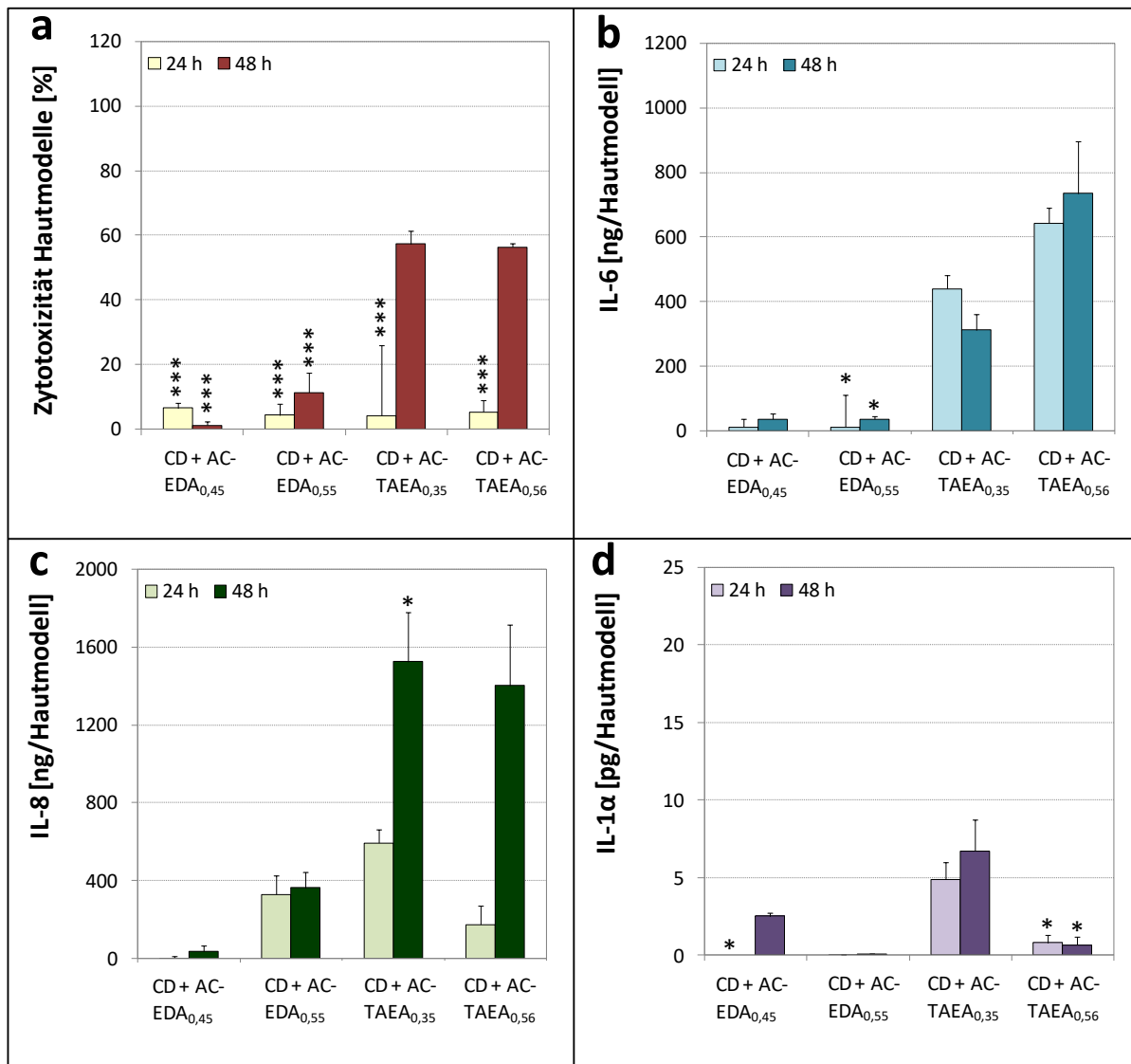
**ABBILDUNG 3-35** Analyse des zytotoxischen Potentials (a) und der Freisetzung der Interleukine IL-6 (b), IL-8 (c) und IL-1 $\alpha$  (d) infolge der Inkubation 3d-Hautmodelle mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) und unterschiedlichen AC mit einer Konzentration von je 10 mg/ml.

Bei Untersuchungen hinsichtlich des zytotoxischen Potentials der Hautmodelle, welche mit *C. albicans* DSM 1386 infiziert und den unterschiedlichen AC inkubiert wurden, können nach 24 h nur geringe Mengen (< 6 %) an LDH nachgewiesen werden (Abbildung 3-36 a). Nach 48-stündiger Inkubation der Hautmodelle mit *C. albicans* DSM 1386 ist nur für AC mit TAEA-Funktionalisierung eine Zunahme des zytotoxischen Potentials auf 56 % (CD + AC-TAEA<sub>0,35</sub>) bzw. 57 % (CD + AC-TAEA<sub>0,56</sub>) erkennbar.

Nach Inkubation der Hautmodelle mit AC mit TAEA als funktioneller Gruppe, werden nach 24 h und 48 h größere Menge an IL-6 ausgeschüttet, als im Vergleich zu den AC mit EDA-Funktionalisierung (Abbildung 3-36 b).

Während sich die freigesetzten Mengen an IL-8 nach 24 h und 48 h bei Hautmodellen, welche mit dem nicht-invasiven Hefepilz und AC-EDA<sub>0,55</sub> inkubiert wurden, nicht wesentlich unterscheiden, so unterscheiden sich diese nach Inkubation mit AC-TAEA. Im Fall von AC-TAEA<sub>0,35</sub> ist im Vergleich zum Messwert bei 24 h nach 48 h eine 2,5-fach größere Menge an IL-8 feststellbar, bei AC-TAEA<sub>0,56</sub> eine 8-fach größere Menge (Abbildung 3-36 c).

Die Freisetzung der Menge an IL-1α ist bei Hautmodellen, welche mit *C. albicans* DSM 1386 und AC-TAEA<sub>0,35</sub> inkubiert wurden, am größten (Abbildung 3-36 d).



**ABBILDUNG 3-36** Analyse des zytotoxischen Potentials (a) und der Freisetzung der Interleukine IL-6 (b), IL-8 (c) und IL-1α (d) infolge der Inkubation 3d-Hautmodelle mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) und unterschiedlichen AC mit einer Konzentration von je 10 mg/ml.

### 3.8.2 Expressionsanalyse von Antimikrobiellen Peptiden und Entzündungsmediatoren in 3d-Hautmodellen

Die Effizienz der RT-qPCR wurde für jedes RNA-Primerpaar überprüft. Die Werte für die Effizienz der Primer liegen im Bereich von 2,81 bis 3,00 (Tabelle 3-5).

TABELLE 3-5 Effizienz der RNA-Primer.

Primerpaar	Effizienz
hBD-3	2,81
LL-37	3,00
IL-1 $\alpha$	2,96
IL-1 $\beta$	2,73
IL-6	2,81
IL-8	2,99
IL-18	2,84

Die Ergebnisse der relativen Expression von AMP und Interleukinen bei 3d-Hautmodellen, welche mit 0,5 % SDS als Positiv-Kontrolle behandelt wurden, zeigen eine hohe Expression der Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-6 sowie IL-8 nach 24- und 48-stündiger Inkubation (Abbildung 3-37 a und b). Bei Hautmodellen, welche mit dem Hefepilz *C. albicans* DSM 1386 infiziert wurden, sind nach 24 h und 48 h keine Auffälligkeiten in den Expressionsraten der AMP und Interleukine erkennbar.

Nach der Infektion der Hautmodelle mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 sind hohe Expressionsraten für IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 mittels RT-qPCR nachweisbar. Im Vergleich zur Untersuchung nach 24 h ist nach 48-stündiger Inkubation der Hautmodelle mit dem invasiv-wachsenden *C. albicans*-Stamm die Expressionsrate des AMP hBD-3 4-fach höher (Abbildung 3-37 b).

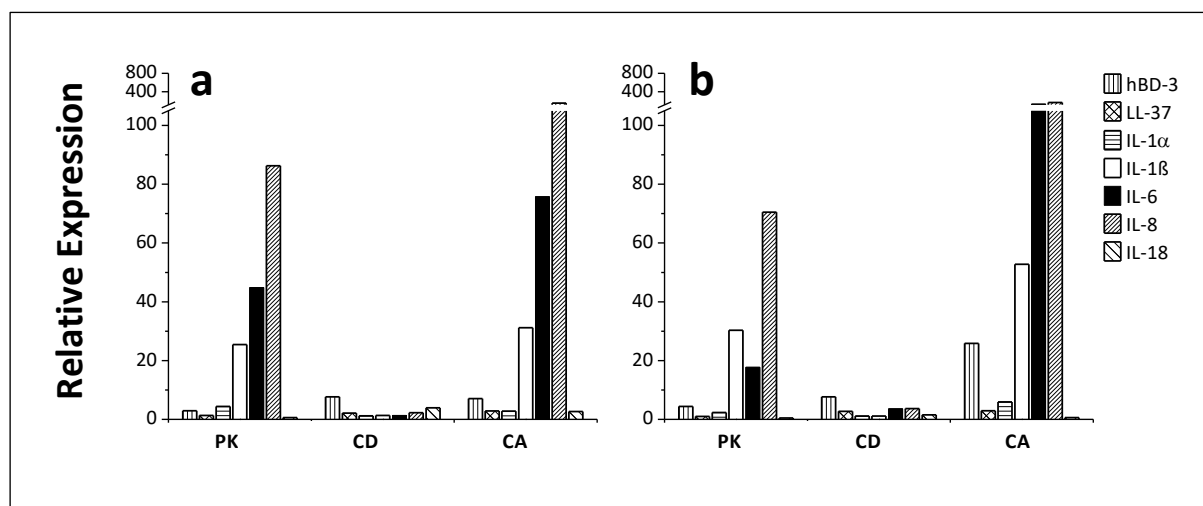


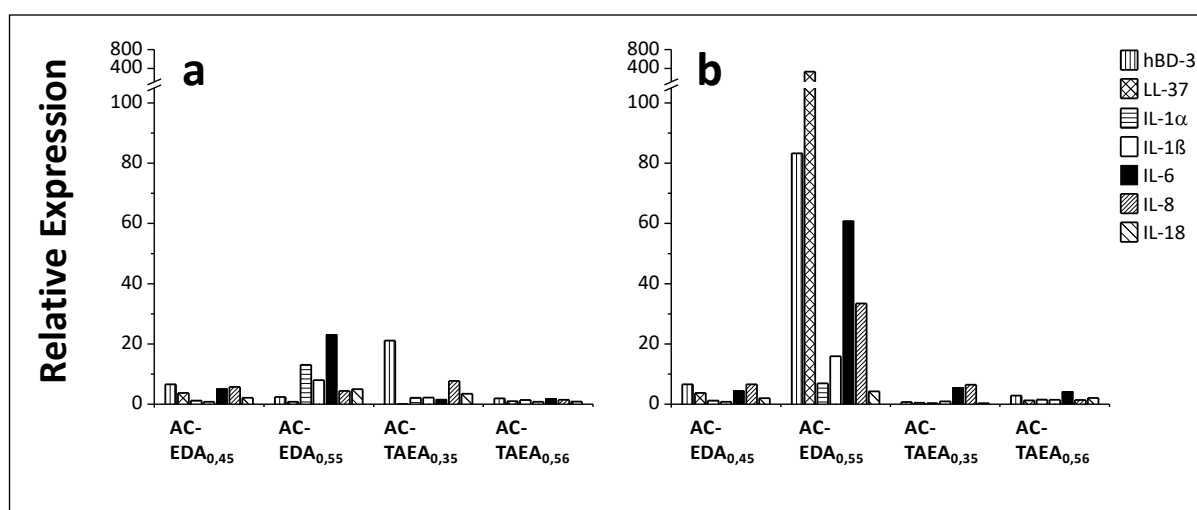
ABBILDUNG 3-37 Die Analyse der relativen Expression der AMP hBD-3 und LL-37, als auch der Entzündungsmediatoren IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-18 der 3d-Hautmodelle, welche 24 h (a) bzw. 48 h (b) mit 0,5 % SDS (als Positiv-Kontrolle, PK) und mit den *C. albicans*-Stämmen DSM 1386 (CD) und ATCC MYA-2876 (CA) inkubiert wurden, erfolgte mittels RT-qPCR.

Nachdem die Hautmodelle mit den unterschiedlichen AC behandelt wurden, zeigen sich bei der Analyse der relativen Expression hohe Expressionsraten von IL-6 und IL-8 infolge der Behandlung

der Hautmodelle mit AC-EDA<sub>0,55</sub> (Abbildung 3-38 a). Nach 48-stündiger Behandlung der Hautmodelle mit AC-EDA<sub>0,45</sub> ist die relative Expression von IL-8, im Vergleich zu dem Wert nach 24 h nahezu 3-fach höher (Abbildung 3-38 b).

Des Weiteren sind Erhöhungen in den Expressionsraten von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 nach 48-stündiger Inkubation der Hautmodelle mit AC-EDA<sub>0,55</sub> im Vergleich zu den Expressionsraten nach 24 h zu beobachten (Abbildung 3-38).

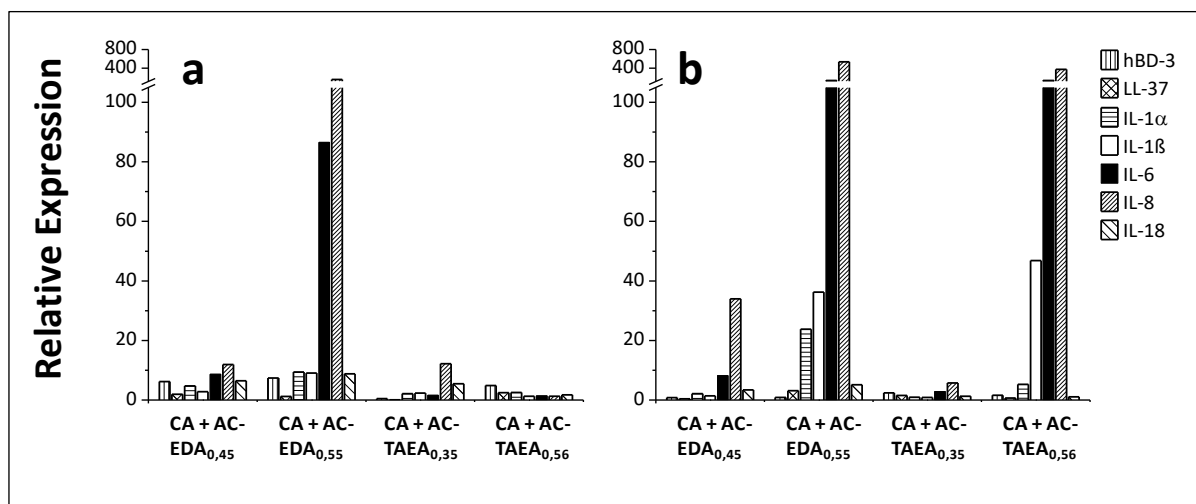
Für AC-TAEA<sub>0,35</sub> sind keine Auffälligkeiten in den Expressionsraten für AMP und Entzündungsmediatoren hervorzuheben. Dahingegen sind im Fall der Behandlung der Hautmodelle mit AC-TAEA<sub>0,56</sub> Erhöhungen der Expressionsraten von IL-1 $\beta$ , IL-6 sowie für IL-8 beim Vergleich der 24 h- und 48 h-Werte zu erkennen (Abbildung 3-38).



**ABBILDUNG 3-38** Die Analyse der relativen Expression der AMP hBD-3 und LL-37, als auch der Entzündungsmediatoren IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-18 der 3d-Hautmodelle, welche 24 h (a) bzw. 48 h (b) mit den verschiedenen AC inkubiert wurden, erfolgte mittels RT-qPCR.

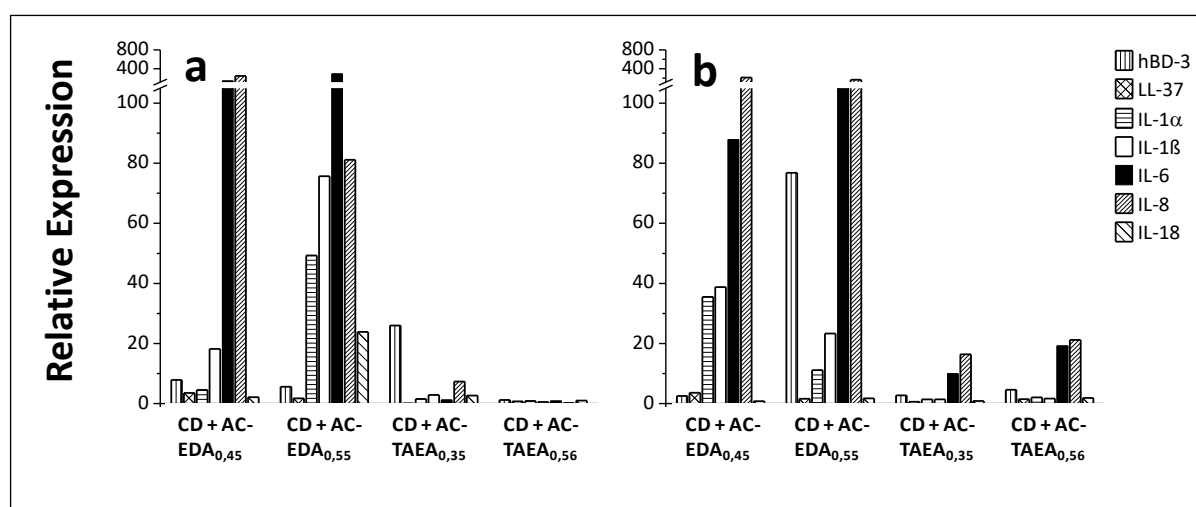
Anhand der Analyse der relativen Expression von AMP und Entzündungsmediatoren infolge der Infektion der Hautmodelle mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 und der Behandlung mit AC ist zum einen die Zunahme der relativen Expression von IL-1 $\alpha$  von 4,5 (24 h) auf 36 (48 h) bei der Behandlung der Hautmodelle mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 und AC-EDA<sub>0,45</sub> zu beobachten. Zum anderen lässt sich eine Zunahme der Expression von hBD-3 um das 36-fache beim Vergleich der 24 h- und 48 h-Werte nach Behandlung der Hautmodelle mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 und AC-EDA<sub>0,55</sub> erkennen (Abbildung 3-39). Des Weiteren sind in diesem Fall ebenfalls höhere Expressionsraten für IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8 zu vermerken, wohingegen sich für IL-6 und IL-18 nach 48 h niedrigere Werte bei der relativen Expression zeigen (Abbildung 3-39).

Nach der Behandlung der infizierten Hautmodelle mit AC, welche TAEA als funktionelle Gruppe aufweisen, sind im Vergleich zu den 24 h-Werten nach 48 h leichte Erhöhungen der relativen Expression von IL-6 und IL-8 zu erkennen (Abbildung 3-39 b).



**ABBILDUNG 3-39** Die Analyse der relativen Expression der AMP hBD-3 und LL-37, als auch der Entzündungsmediatoren IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-18 der 3d-Hautmodelle, welche 24 h (a) bzw. 48 h (b) mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) und den verschiedenen AC inkubiert wurden, erfolgte mittels RT-qPCR.

Nachdem die Hautmodelle mit *C. albicans* DSM 1386 infiziert und mit den unterschiedlichen AC behandelt wurden, zeigen sich bei der Analyse der relativen Expression von AMP und Interleukinen nach 48 h Erhöhungen in den Expressionsraten von hBD-3, LL-37, IL-6 und IL-8 infolge der Behandlung der infizierten Hautmodelle mit AC-EDA<sub>0,55</sub> (Abbildung 3-40).



**ABBILDUNG 3-40** Die Analyse der relativen Expression der AMP hBD-3 und LL-37, als auch der Entzündungsmediatoren IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-18 der 3d-Hautmodelle, welche 24 h (a) bzw. 48 h (b) mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) und den verschiedenen AC inkubiert wurden, erfolgte mittels RT-qPCR.

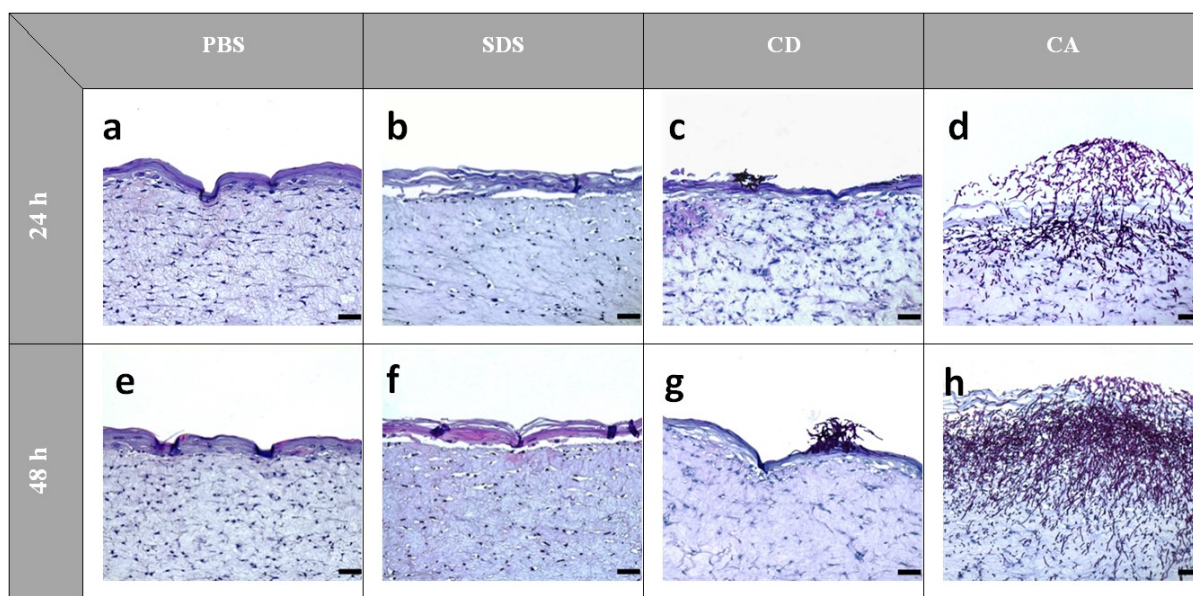
### 3.8.3 Histologische Untersuchung der 3d-Hautmodelle nach Inkubation mit AC

Bei den unbehandelten Hautmodellen lässt sich ein mehrschichtiger Aufbau erkennen. Die Keratinozyten befinden sich dicht aneinander gereiht in der Epidermis. Die Fibroblasten sind großflächig in der Kollagenmatrix verteilt und bilden die Dermis. Im Allgemeinen beträgt die durchschnittliche Dicke der Epidermis bei unbehandelten Hautmodellen 75  $\mu$ m. Die Dermis weist im

Durchschnitt eine Stärke von 1000  $\mu\text{m}$  auf. Bei den histologischen Schnitten dieser Hautmodelle sind natürlich vorkommende Einstülpungen erkennbar (Abbildung 3-41 a und e).

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kommt es infolge der Behandlung mit SDS zum Ablösen und zu einem zerklüfteten Erscheinungsbild der Epidermis. Nach einer Inkubation von 24 h kann man bereits ein Ablösen der Epidermis erkennen (Abbildung 3-41 b), wobei noch einige Stellen mit der darunterliegenden Dermis verbunden sind.

Nach 48 h ist eine vollständige Ablösung erkennbar (Abbildung 3-41 f). Zudem sind nach beiden Inkubationszeiten Auflockerungen in der Dermis erkennbar. Wurden die Hautmodelle mit dem *C. albicans* Stamm DSM 1386 inkubiert, so sind einzelne Ansammlungen von Blastosporen und Pseudohyphen oberhalb der Epidermis der Hautmodelle erkennbar (Abbildung 3-41 c und g). Hierbei zeigt sich keine Penetration in die Epidermis. Im Gegensatz dazu zeigen sich bei Hautmodellen, welche mit dem *C. albicans* Stamm ATCC MYA-2876 inkubiert wurden, Hyphen, welche die Epidermis und die Dermis invasiv durchdringen (Abbildung 3-41 d und h). Bei den mikroskopischen Bildern ist kaum eine Abgrenzung der Dermis von der Epidermis erkennbar.



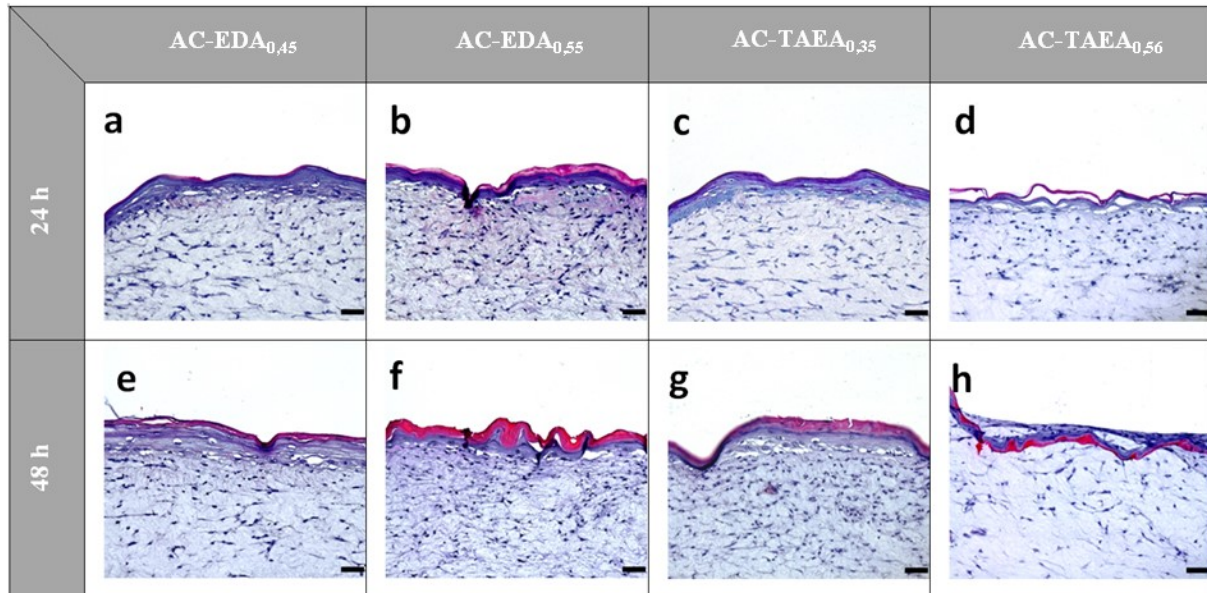
**ABBILDUNG 3-41** 3d-Hautmodelle wurden für 24 h (obere Reihe; a bis d) bzw. für 48 h (untere Reihe; e bis h) mit PBS (als Negativ-Kontrolle; a und e), SDS (als Positiv-Kontrolle; b und f), *C. albicans* DSM 1386 (CD; c und g) bzw. mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA; d und h) inkubiert und nach histologischer Präparation am Durchlichtmikroskop fotografiert. Die Hautmodell-Präparate wurden mit HE (PBS und SDS) bzw. mit PAS (*C. albicans*) angefärbt. Die Balkenlänge entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

Bei einer Inkubation der Hautmodelle mit den unterschiedlichen AC lassen sich nach dem Anfärben der histologischen Schnitte mit HE auf der Oberseite der Hautmodelle mehr oder weniger stark pinkgefärbte Schichten erkennen (Abbildung 3-42).

Bei den Hautmodellen, welche 24 h mit AC-EDA<sub>0,45</sub> bzw. AC-TAEA<sub>0,35</sub> inkubiert wurden, lässt sich eine dünne pinke Schicht auf der Epidermis erkennen (Abbildung 3-42 a und c). Diese ist bei der Dokumentation nach 48 h deutlicher zu erkennen (Abbildung 3-42 e und g).



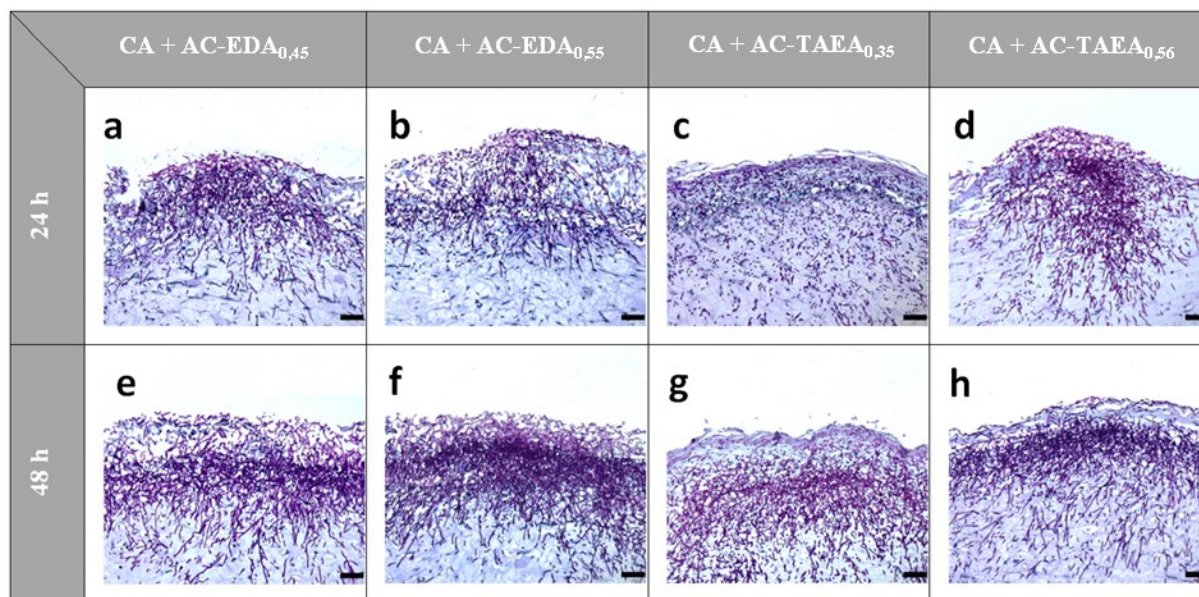
Wurden die Hautmodelle mit AC-EDA<sub>0,55</sub> inkubiert, so sind im Vergleich zu den anderen Abbildungen dicke pinkangefärbte Schichten zu erkennen (Abbildung 3-42 b und f). Bei der 48 h-Aufnahme des Hautmodells nach Behandlung mit AC-TAEA<sub>0,56</sub> ist die Epidermis nach unten auf die Dermis geklappt (Abbildung 3-42 h). Hierbei lässt sich ebenfalls eine dicke pinke Schicht erkennen.



**ABBILDUNG 3-42** 3d-Hautmodelle wurden für 24 h (obere Reihe; a bis d) bzw. für 48 h (untere Reihe; e bis h) mit vier AC, welche unterschiedliche Funktionalisierungen und DS-Werte aufweisen, inkubiert (AC-EDA<sub>0,45</sub>: a und e; AC-EDA<sub>0,55</sub>: b und f; AC-TAEA<sub>0,35</sub>: c und g; AC-TAEA<sub>0,56</sub>: d und h). Nach histologischer Präparation und Färbung mit HE, wurden die Hautmodellschnitte am Durchlichtmikroskop fotografiert. Die Balkenlänge entspricht 50 µm.

Die Behandlung der Hautmodelle mit den unterschiedlichen AC hat keinen Einfluss auf das invasive Wachstum des *C. albicans* Stamm ATCC MYA-2876. Nach histologischer Präparation und Mikroskopie zeigt sich bei allen AC ein ähnliches Bild (Abbildung 3-43).

Nach 24-stündiger Inkubation mit dem Hefepilz und der jeweiligen AC sind die Hyphen bereits bis in die Dermis der Hautmodelle gewachsen (Abbildung 3-43 a bis d). Nach 48 h ist das Hyphengeflecht sehr dicht und hat die Hautmodelle zum Teil komplett durchwachsen (Abbildung 3-43 e bis h).



**ABBILDUNG 3-43** 3d-Hautmodelle wurden zunächst mit dem Hefepilz *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) infiziert und anschließend für 24 h (obere Reihe; a bis d) bzw. 48 h (untere Reihe; e bis h) mit unterschiedlichen AC inkubiert (AC-EDA<sub>0,45</sub>: a und e; AC-EDA<sub>0,55</sub>: b und f; AC-TAEA<sub>0,35</sub>: c und g; AC-TAEA<sub>0,56</sub>: d und h). Nach histologischer Präparation und PAS-Färbung, wurden die Hautmodellschnitte am Durchlichtmikroskop fotografiert. Die Balkenlänge entspricht 50 µm.

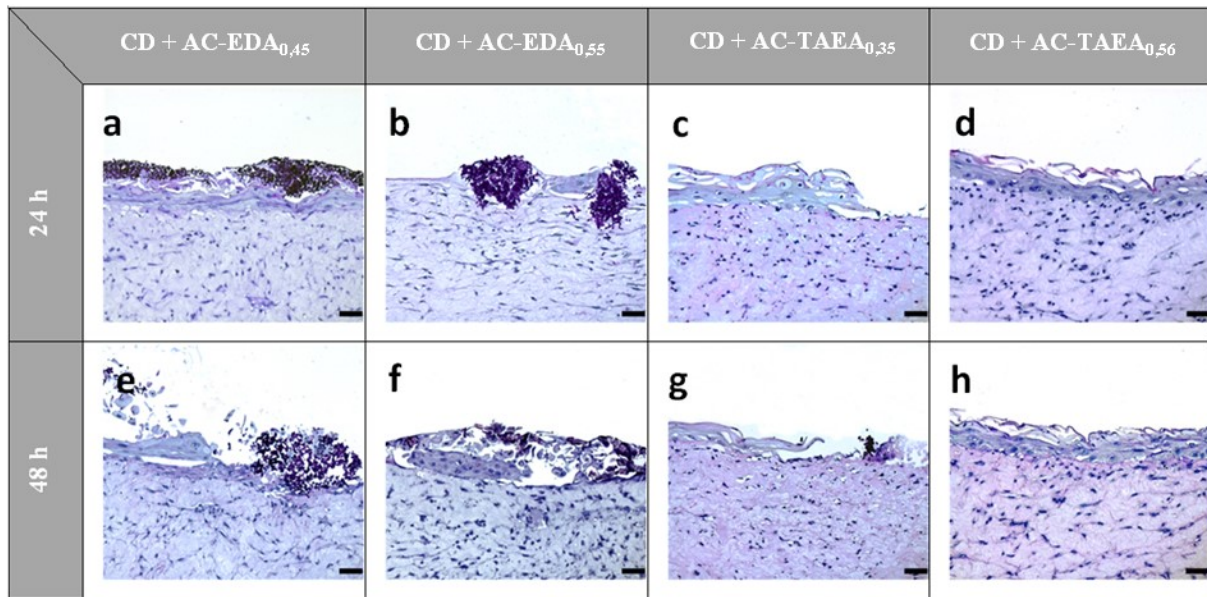
Anhand der mikroskopischen Bilder von Hautmodellen, welche zunächst mit dem *C. albicans*-Stamm DSM 1386 infiziert und anschließend mit AC behandelt wurden, sind unterschiedliche Effekte erkennbar (Abbildung 3-44).

Bei der Inkubation der Hautmodelle mit dem nicht-invasiv wachsenden *C. albicans* Stamm und AC-EDA<sub>0,45</sub> sind nach 24 h viele Blastosporen oberhalb der Epidermis erkennbar (Abbildung 3-44 a). Weitere 24 h später sind an vereinzelten Stellen Anhäufungen mit Blastosporen sichtbar. Zudem sind vereinzelt Pseudohyphen erkennbar. Die Epidermis weist Schäden auf und zum Teil sind einzelne Zellverbände innerhalb der Schicht losgelöst (Abbildung 3-44 e).

Wurden die Hautmodelle mit *C. albicans* DSM 1386 und AC-EDA<sub>0,55</sub> inkubiert, so zeigen sich vereinzelt Anhäufungen von Blastosporen, wobei die Epidermis zum Teil Schäden aufweist und zerklüftet aussieht (Abbildung 3-44 b und f).

Schäden der Epidermis sind auch bei Hautmodellen, welche mit AC-TAEA<sub>0,35</sub> und *C. albicans* DSM 1386 inkubiert wurden, erkennbar. Nach 24 h sind keine Lebensformen des Hefepilzes zu finden (Abbildung 3-44 c). Nach 48-stündiger Inkubation ist eine kleine Ansammlung von Blastosporen oberhalb des Hautmodells zu finden (Abbildung 3-44 g).

Bei den mikroskopischen Aufnahmen der Hautmodelle nach Inkubation mit dem nicht-invasiv wachsenden Hefestamm und AC-TAEA<sub>0,56</sub>, können keine Hefezellen nachgewiesen werden. Zudem ist bei diesen Aufnahmen teilweise ein Ablösen der Hornschicht erkennbar (Abbildung 3-44 d und h).



**ABBILDUNG 3-44** 3d-Hautmodelle wurden zunächst mit dem Hefepilz *C. albicans* DSM 1386 (CD) infiziert und anschließend für 24 h (obere Reihe; a bis d) bzw. 48 h (untere Reihe; e bis h) mit unterschiedlichen AC inkubiert (AC-EDA<sub>0,45</sub>: a und e; AC-EDA<sub>0,55</sub>: b und f; AC-TAEA<sub>0,35</sub>: c und g; AC-TAEA<sub>0,56</sub>: d und h). Nach histologischer Präparation und PAS-Färbung, wurden die Hautmodellschnitte am Durchlichtmikroskop fotografiert. Die Balkenlänge entspricht 50 µm.

## 4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden vier AC mit unterschiedlichen Funktionalisierungen und DS auf ihre antimikrobielle Wirkung und ihre Zellverträglichkeit in 2d- und 3d-Zellkulturmodellen untersucht. Aufgrund der kationischen Aminogruppen und der damit vermuteten antimikrobiellen Wirkung wurden die AC auf ihre Wirkung gegenüber dem opportunistisch humanpathogenen Hefepilz *C. albicans* mit einer nephelometrischen Wachstumsuntersuchung und einer sich anschließenden Analyse des mikrobiellen ATP-Gehalts analysiert. Zur Untersuchung der Zellverträglichkeit der AC gegenüber HaCaT-Keratinocyten wurde ein *in-vitro* Modellsystem gewählt. Die Wirkung der AC auf humane und mikrobielle Zellen wurde des Weiteren in einem *in-vitro* Co-Kulturmodell aus HaCaT-Keratinocyten und *C. albicans* untersucht. Um den Aspekt *in-vivo* ähnlicher Bedingungen abzubilden, wurde ein 3d-Hautmodell bestehend aus einer von NHEK bildenden Epidermis und einer von NHDF-bildenden Dermis für die Untersuchungen unter Laborbedingungen gezüchtet. An diesen Hautmodellen wurde ebenfalls die Wirkung der AC untersucht. Hierbei wurden die 3d-Hautmodelle, wie die 2d-Co-Kulturmodelle, ebenfalls mit *C. albicans* infiziert. Anhand von biochemischen, molekularbiologischen und mikroskopischen Untersuchungsmethoden wurde die Wirkung der einzelnen AC in den genannten Modellsystemen analysiert.

Im Vorfeld dieser Dissertation wurden AC mit unterschiedlichen Ausgangscellulosen, funktionellen Gruppen und DS hinsichtlich ihrer Zellverträglichkeit gegenüber HaCaT-Keratinocyten und ihrer antimikrobiellen Wirkung gegenüber pathogenen Bakterien, Hefepilzen und Dermatophyten untersucht. Als Ausgangscellulosen wurden neben Avicel, mit einem DP von 330, Cellunier F (DP = 454), FISI (DP = 611) und abgebaute Cellulose (DP = 111) untersucht. Als funktionelle Gruppen wurden Ethylendiamin (EDA), Triaminotriethylamin (TAEA), Diethylentriamin (DETA), Triethylentetramin (TETA), Tetraethylenpentamin (TEPA) und Pentaethylenhexamin (PEHA) analysiert. Der DS der untersuchten AC lag im Bereich von 0,35 bis 1,67<sup>29,30,33-37,51</sup>.

Anhand der Ergebnisse aus den Voruntersuchungen hat sich gezeigt, dass AC mit der Ausgangscellulose Avicel und der funktionellen Gruppe EDA im Vergleich zu den anderen AC die höchste Zellverträglichkeit gegenüber HaCaT-Keratinocyten aufwiesen. AC mit TAEA-Funktionalisierung zeigten vergleichsweise eine geringere Zellverträglichkeit gegenüber HaCaT-Keratinocyten sowie eine bessere antibakterielle Wirkung<sup>37</sup>.

Aufgrund der hohen Zellverträglichkeit und dem hohen antimikrobiellen Potential wurden für diese Dissertation AC mit EDA- bzw. TAEA-Funktionalisierung auf Basis einer Avicel-Cellulose als Ausgangssubstanz mit einem maximalen DS von 0,56 ausgewählt und mit unterschiedlichen Methoden biologisch charakterisiert.

## 4.1 Untersuchungen der AC auf Endotoxine, Mutagenität und antioxidative Wirkung

Bevor die AC auf Biofunktionalität und Biokompatibilität untersucht wurden, sind diese zunächst auf mögliche Verunreinigungen mit Endotoxinen und auf eine mutagene Wirkung untersucht worden. Aufgrund dessen, dass die getesteten AC als wässrige Lösungen zur Verfügung standen, wäre eine potentielle Verunreinigung mit Endotoxinen möglich. Das Vorhandensein von Endotoxinen in den Testlösungen kann sich negativ auf die Charakterisierung der Verträglichkeit gegenüber humanen Zellen und der antimikrobiellen Wirkung auswirken, da Endotoxine zytotoxisch wirken können und daher die Ergebnisse der Untersuchungen auf Biofunktionalität und Biokompatibilität verfälschen würden.

Bei dem LAL-Test handelt es sich um ein sensibles Testverfahren, welches zum quantitativen Nachweis von Endotoxin eingesetzt wird. Dieser Test beruht auf einem kinetisch-chromogenen Nachweis bakterieller Endotoxine, bei welchem Glukanverbindungen den Test stören und zu falsch-positiven Ergebnissen führen können<sup>63</sup>. Im Fall der AC wurde ein Glukanblocker eingesetzt und es wurden verschiedene AC-Verdünnungen getestet. Aufgrund der Trübungseigenschaften der AC war eine starke Verdünnung der Stammlösungen (1:10000) notwendig, um die erforderliche Wiederfindungsrate der positiven Produktproben zu erreichen und damit ein gültiges Testergebnis zu erzielen.

Für die getesteten AC konnten keine Verunreinigungen mit Endotoxinen nachgewiesen werden und somit lassen sich eine Zellunverträglichkeit, als auch eine antimikrobielle Wirkung allein auf die Wirkung der AC beziehen.

Hinsichtlich einer mutagenen Wirkung wurden die AC mit einem Ames-Test untersucht. Dieser Test wurde von Maron und Ames beschrieben<sup>78</sup>. Mit Hilfe dieses Tests konnte für alle getesteten AC eine mutagene Wirkung ausgeschlossen werden.

Die Fähigkeit von AC als Antioxidantien zu wirken, wurde mittels eines Chemilumineszenz-Assay auf Grundlage von Pholasin analysiert. Antioxidantien fungieren als Radikalfänger und können die oxidative Wirkung von ROS und RNS abfangen. Oxidantien, wie ROS und RNS, sind aufgrund freier Elektronen reaktionsfreudige Moleküle, die bei übermäßiger Ansammlung innerhalb von Zellen oxidativen Stress auslösen können. Oxidativer Stress kann in den Zellen zu Schädigungen und Zerstörung von Nukleinsäuren, Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten führen<sup>44</sup>.

Für AC mit TAEA-Funktionalisierung konnten antioxidative Eigenschaften gegenüber ROS nachgewiesen werden. Dabei hat der DS keinen Einfluss auf die antioxidative Wirkung, da für beide AC vergleichbare Werte ermittelt werden konnten. AC mit EDA-Funktionalisierung waren weder in der Lage ROS noch RNS zu hemmen. Für AC mit TAEA-Funktionalisierung konnte ebenfalls keine Hemmung von RNS gezeigt werden.

Die Beobachtung, dass AC mit TAEA-Funktionalisierung, im Gegensatz zu AC mit EDA-Funktionalisierung, effizient Sauerstoffradikale binden und hemmen können, ist vermutlich in der chemischen Struktur und der Anzahl an reaktiven funktionellen Gruppen begründet. TAEA weist drei Aminogruppen auf, welche verzweigt an einem Stickstoffatom gebunden vorliegen. In der linearen Verbindung EDA sind nur zwei Aminogruppen vorhanden, wobei nur eine Aminogruppe pro funktionalisierter AGU in den AC frei zugänglich ist. Im Fall von TAEA-funktionalisierten AC sind es zwei freie Aminogruppen. Aufgrund der höheren Anzahl an funktionellen Gruppen bei AC mit TAEA-Funktionalisierung ist eine Hemmung von ROS möglich.

## 4.2 Biofunktionalität von AC

In dieser Arbeit wurde die Biofunktionalität von AC als antimikrobielle Wirkung beschrieben. Zur Charakterisierung der Biofunktionalität wurde der opportunistisch humanpathogene Hefepilz *C. albicans* mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen AC über einen Zeitraum von 24 h in einem MTP-Lasernephelometer inkubiert. Dabei wurden stündlich die Trübungswerte der Lösungen gemessen, welche zur Darstellung von Wachstumskurven verwendet wurden. Hierbei sind Rückschlüsse auf die Wirkung der AC im Einzelnen auf *C. albicans* möglich. Beim Vergleich der beiden unbehandelten *C. albicans*-Stämmen zeigten sich keine Unterschiede, sowohl im Wachstumsverhalten, als auch bei der sich anschließenden Untersuchung des mikrobiellen ATP-Gehalts und der Überprüfung auf eine fungistatische bzw. fungizide Wirkung. Daher erfolgte bei den Ergebnissen keine Unterscheidung zwischen den beiden *Candida*-Stämmen.

Thewes et al. beobachteten ebenfalls, dass die beiden *C. albicans*-Stämme SC5314 (analog zu *C. albicans* ATCC-MYA 2786) und ATCC 10231 (analog zu *C. albicans* DSM 1386) identische Wachstumseigenschaften aufweisen <sup>112</sup>.

Die MLN ist eine effiziente Methode zur Untersuchung des mikrobiellen Wachstums <sup>31,32,39,50</sup>. Doch bei trüben Testlösungen stößt diese Nachweismethodik an ihre Grenzen. Bei den Wachstumsuntersuchungen von *C. albicans* unter Einfluss von AC war auffällig, dass insbesondere die Eigenschaft der AC bei hohen Konzentrationen die Lösungen zu trüben einen negativen Einfluss auf diese Testmethode aufzeigen. Da die Art der Messung auf der Trübung einer Lösung beruht, hat dies Auswirkungen auf die grafische Darstellung von Wachstumskurven. Je mehr Partikel sich in einer Lösung befinden, desto stärker wird der Laserstrahl gestreut und umso höher ist das gemessene Signal. Insbesondere bei hohen AC-Konzentrationen zeigten die mitgeführten Leerwerte eine deutliche Trübung. Bei der graphischen Darstellung zeigte sich dies durch ein Verschieben des Maximums im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Ergebnisse der nephelometrischen Untersuchung sind daher kritisch zu bewerten und konnten nicht zur Berechnung von IC<sub>50</sub>-Werten verwendet werden, da infolge der Trübung die Ergebnisse verfälscht worden sind.

In einer Studie mit Cyclodextrin-Antiseptika-Komplexen zeigten sich hinsichtlich deren antimikrobiellen Wirkung eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse anhand der MLN und des ATP



Biolumineszenz Assays, obwohl die Untersuchungen auf unterschiedlichen Nachweismethoden beruhen<sup>32</sup>. Diese Aussage konnte in einer weiteren Studie bestätigt werden<sup>31</sup>.

Im Fall der AC lieferte die biochemische Untersuchung hinsichtlich des antimikrobiellen ATP-Gehalts im Anschluss an die Wachstumsuntersuchung von *C. albicans* aussagekräftige Ergebnisse, da das Messprinzip dieser Methode auf einer Enzymreaktion beruht. Es zeigte sich für alle AC eine Konzentrationsabhängigkeit der antimikrobiellen Wirkung. Mit zunehmender AC-Konzentration konnte für alle AC eine Abnahme der mikrobiellen Viabilität beobachtet werden. Die antimikrobielle Wirkung war abhängig von der Funktionalisierung der AC, aber es konnte keine eindeutige Abhängigkeit vom DS beobachtet werden. AC mit TAEA-Funktionalisierung zeigten eine bessere antimikrobielle Wirkung, als AC mit EDA-Funktionalisierung. Anhand der ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte zeigte sich für AC-TAEA<sub>0,35</sub> die beste antimikrobielle Wirkung und für AC-EDA<sub>0,45</sub> die geringste Wirkung gegenüber *C. albicans*.

Zusätzlich zur Bestimmung des mikrobiellen ATP-Gehalts, wurde im Anschluss an die Wachstumsuntersuchungen von Lösungen ohne sichtbares mikrobielles Wachstum Proben auf Agarplatten ausplattiert, um Rückschlüsse auf eine fungistatische bzw. fungizide Wirkung der AC zu ermöglichen. Bei einer fungistatischen Wirkung sind bei Proben ohne sichtbares Wachstum nach dem Ausplattieren auf festem Kulturmedium nach 24 h Kolonien erkennbar, wobei bei einer fungiziden Wirkung die mikrobiellen Zellen abgetötet wurden und somit keine Kolonien auf den Agarplatten erscheinen. Für alle AC konnte mit dieser Methode eine fungizide Wirkung bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigen zwar eine konzentrationsabhängige Wirksamkeit der AC gegenüber *C. albicans*, jedoch ist damit der Wirkmechanismus der AC nicht erklärbar.

Mit dieser Arbeit wurde erstmals die Wirkung von AC anhand mikroskopischer Bilder in biologischen Modellsystemen beschrieben. Beim Betrachten von *C. albicans*-Kulturen, welche mit AC inkubiert wurden, fielen in der Durchlichtmikroskopie Partikel auf, welche deutlich kleiner als die Hefezellen waren und deren Häufigkeit mit zunehmender AC-Konzentration ebenfalls zunahm. Hier lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den Partikeln um AC handeln könnte. Zur Überprüfung dieser These wurde, eine fluoreszenzmarkierte AC hergestellt. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigten sich ebenfalls Partikel in entsprechender Größe, welche durch eine gelbe Fluoreszenz nachgewiesen werden konnten. Die mikroskopische Untersuchung von *C. albicans* nach Inkubation mit der fluoreszierenden AC zeigte, neben fluoreszierten AC-Partikeln auch eine Fluoreszenz von *C. albicans*-Zellen, welche nicht mit einem Farbstoff markiert bzw. fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht wurden. Hierbei schien es, als dass die Hefezellen infolge der Inkubation mit der fluoreszierenden AC ihre Membranintegrität verloren haben bzw. die Zellen durch die AC geschädigt wurden und die fluoreszierende AC in das Innere der Hefezellen gelangen konnte, was dazu führte, dass die geschädigten Zellen blau fluoreszierten.

Ganske et al. publizierten antimikrobielle Wirkungen von Cellulose-Carbamaten mit Aminogruppen-Funktionalisierung gegenüber *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*,

*Klebsiella pneumoniae* und *Candida albicans* <sup>40</sup>. Dabei vermuteten sie, dass Cellulose-Carbamate mit der negativ geladenen Zellmembran von Mikroorganismen interagieren und dadurch Löcher in den mikrobiellen Zellmembranen entstehen, was zum Zelltod führt. Als mögliche Mechanismen zitieren sie die Modellvorstellungen, welche von Toke et al. in einem Review zusammengefasst wurden <sup>113</sup>. Diese unterscheiden in ein „*barrel-stave model*“, ein „*carpet-model*“ und ein „*toroid/wormhole model*“. Bei dem „*barrel-stave model*“ bilden einzelne Peptide, ähnlich in einem Holzfass, Dauben-ähnliche Strukturen in der Zellmembran, wobei eine Pore entsteht. Starke elektrostatische Interaktionen zwischen den positiv-geladenen Seitenketten der Peptide und den negativ-geladenen Kopfgruppen der Membranlipide führen bei dem „*carpet-model*“ zur Zerstörung der Membranorganisation. Bei dem „*toroid/wormhole model*“ kommt es, wie bei dem „*barrel-stave model*“, zur Porenbildung innerhalb der Membran. Anders als bei dem „*barrel-stave model*“ kommt es hierbei zu einer Neuausrichtung der Membranlipide, sodass die Peptidketten und die Kopfgruppen der Membranlipide die Innenwand der Pore bilden <sup>113</sup>.

In der Literatur sind weitere Hinweise auf den Wirkmechanismus von positiv-geladenen Polymeren zu finden. Für Chitosan, welches strukturell ähnlich zu AC ist, wird zwar eine breite antimikrobielle Wirkung gegen gram-positive und gram-negative Bakterien, Hefen und andere Pilze aufgelistet, doch mit Hinblick auf den Wirkmechanismus wird meist nur die Wirkung auf Bakterien näher betrachtet <sup>6</sup>. Es wurden verschiedene Hypothesen zum Wirkmechanismus aufgestellt. Am häufigsten wird der polykationische Charakter des natürlich vorkommenden Chitosans zur Erklärung zitiert. Dabei kommt es zu einer Interaktion der positiv-geladenen Aminogruppen mit negativ-geladenen Oberflächenmolekülen der bakteriellen Zellmembran, was zu einer Permeabilität und Lyse der Zellmembran führt <sup>53</sup>. Auf der anderen Seite wird vermutet, dass Chitosan innerhalb von Zellen mit Nukleinsäuren interagiert und es zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese kommt. Auf der anderen Seite wird vermutet, dass Chitosan auf Zelloberflächen eine polymere Hülle ausbilden kann und somit den Stoffaustausch behindert <sup>6</sup>. Ein weiterer Ansatz ist, dass das mikrobielle Wachstum gestört wird, indem Chitosan bei der Kultivierung im flüssigen Nährmedium Komplexe mit Nährstoffen, wie beispielsweise essentiellen Metallen, ausbildet <sup>53</sup>. Die Wirkung von Chitosan wird als Abhängigkeit von der Spezies, dem Zellalter, dem Molekulargewicht, der Konzentration, dem pH-Wert, der Temperatur und der positiven Ladungsdichte im Molekül beschrieben <sup>67 53</sup>.

Seyfarth et al. konnten mittels MLN antimikrobielle Wirkungen von Chitosanderivaten gegenüber *C. albicans*, *C. krusei* und *C. glabrata* zeigen <sup>105</sup>. Sie vermuteten, dass die kationischen Aminogruppen von Chitosan mit anionischen Zellwandkomponenten, insbesondere mit Sphingolipiden interagieren. Infolge dessen kommt es zur Permeabilisierung der Hefezellen und letztlich zur Zelllyse.

Neben der Fluoreszenzmikroskopie zeigten sich auch in der Elektronenmikroskopie Partikel, welche mit den Hefezellen assoziiert waren. Bei diesen Partikeln, welche Durchmesser von 160 nm bis 500 nm aufwiesen, wurde ebenfalls vermutet, dass es sich um AC handelt. Bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen war zu erkennen, dass die Partikel an die Hefezellen



gebunden sind. Aufgrund dieser Interaktion ist vermutlich die antimikrobielle Wirkung zu begründen. Bei der Inkubation von *C. albicans* mit einer AC-Konzentration von 313 µg/ml über einen Zeitraum von 96 h, zeigten sich hauptsächlich an Pseudohyphen diese Partikel. Im Verlaufe der längeren Inkubationszeit kommt es zu einem Nährstoffmangel, wodurch es vermehrt zur Ausbildung von Pseudohyphen kommt. Durch den Morphologiewechsel von der Blastospore zur Hyphe ist *C. albicans* in der Lage sich räumlich aus zu breiten, um neue Nährstoffquellen erschließen zu können. Als Blastospore ist *C. albicans* immobil. Während des hyphalen Wachstums nehmen *Candida*-Zellen im Gegensatz zur ovalen Blastospore eine in die Länge gestreckte, zylindrische Zellform an. Chemisch gesehen unterscheidet sich die Zellwand der Hyphen von denen der Blastosporen durch einen zwei- bis dreifach höheren Gehalt an Chitin <sup>85</sup>. Hypothetisch kann man behaupten, dass es aufgrund der veränderten chemischen Zusammensetzung der Pseudohyphen es bei längeren Inkubationszeiten hauptsächlich zur Anlagerung von AC-Partikel an Pseudohyphen gekommen ist.

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von AC-Partikeln könnte die Veröffentlichung von Nikolajski et al. liefern <sup>84</sup>. Sie konnten für Nanopartikel aus 6-Deoxy-6-(aminoalkyl) Aminocellulose-Carbamaten eine reversible Selbstorganisation zeigen. Die, mit dieser Publikation veröffentlichten elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Nanopartikel, weisen in Form und Größe eine Übereinstimmung zu den Partikeln, welche in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *C. albicans* nach Inkubation mit AC zu erkennen sind, auf. Somit lässt sich die Vermutung, dass es sich bei den Partikeln um AC handelt, bestätigen.

Die Bildung von definierten Oligomeren bei AC wurde erstmals von Heinze et al. beschrieben und sie vermuteten, dass es aufgrund der Selbstorganisation der AC zu teilweise reversiblen Wechselwirkungen mit biologischen Makromolekülen kommen kann <sup>47</sup>. Später konnten Nikolajski et al. eine vollständig reversible Wechselwirkung (Tetramerisierung) von 6-Deoxy-6-(aminoalkyl) Aminocellulosen zeigen <sup>83</sup>.

Bei hohen AC-Konzentrationen (ab 625 µg/ml) war in der Elektronenmikroskopie ein dichter Film rings um die Hefezellen zu erkennen. Hierbei kann vermutet werden, dass aufgrund der Ausbildung eines dichten AC-Films, die mikrobiellen Zellen in ihrem Metabolismus negativ beeinflusst werden, sodass kein Stoffaustausch bzw. Aufnahme von Nährstoffen aus dem umgebenden Medium stattfinden konnten und demzufolge die Zellen zugrunde gingen.

Die Ausbildung von ultradünnen und transparenten Filmen von AC wurde bereits auf verschiedenen abiotischen Oberflächen beschrieben, doch die Beobachtung der Ausbildung eines zusammenhängenden Films um Hefezellen von *C. albicans*, insbesondere bei hohen AC-Konzentrationen, ist neu und liefert Hinweise auf die Wirkweise von AC <sup>49,59</sup>.

### 4.3 Biokompatibilität von AC

Mit Hinblick auf potentielle medizinische Anwendungsbereiche für AC, insbesondere für Anwendungen auf der Haut, ist die Charakterisierung der Biokompatibilität von großer Bedeutung zur Einschätzung der Zellverträglichkeit <sup>64,79,93,122</sup>.

Neben der Biofunktionalität wurde die Biokompatibilität von AC in 2d-Modellen mit HaCaT-Keratinocyten untersucht. Keratinocyten bilden bei Epithelien die äußerste Barriere und somit die erste Kontaktstelle von Mikroorganismus und Mensch. Mit 90 % bilden sie den größten Anteil an Zellen in der humanen Haut und stellen ein interessantes Forschungsobjekt dar. Dabei sind vor allem permanente Zelllinien mit hohen Proliferationsraten von großem Interesse.

Für die 2d-Kulturmodelle wurden HaCaT-Keratinocyten als Modellsystem gewählt, da sie im Gegensatz zu NHEK eine hohe Immortalität aufweisen und dabei ihre volle terminale Differenzierungsfähigkeit und biochemische Leistungsfähigkeit beibehalten <sup>10,12</sup>. HaCaT-Keratinocyten bilden, ebenso wie NHEK, einen Monolayer und zeigen die gleiche phänotypische Morphologie. Es wurden Vergleiche in der Zelladhäsion, den Zellinteraktionen und in der Reaktion auf zytotoxische Ereignisse gefunden <sup>12</sup>.

Bei der Charakterisierung der Biokompatibilität von AC in dem 2d-HaCaT-Kulturmodell zeigte sich eine Abhängigkeit der Zellverträglichkeit von der AC-Konzentration, der Inkubationsdauer, dem DS und von der funktionellen Gruppe der AC. Bei allen AC konnte mit zunehmender Konzentration eine Abnahme der Zellverträglichkeit beobachtet werden. Dabei war der Einfluss auf die HaCaT-Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h größer, als nach einer 24-stündigen Inkubation. Anhand der berechneten LC<sub>50</sub>-Werte konnte gezeigt werden, dass nach 48-stündiger Inkubation der HaCaT-Keratinocyten mit AC die halbmaximale letale Konzentration im Durchschnitt um nahezu das Anderthalbfache abgenommen hat. Im Fall von AC-EDA<sub>0,55</sub> wurde im Vergleich zum LC<sub>50</sub>-Wert nach 24-stündiger Inkubationszeit nach 48 h eine Abnahme des LC<sub>50</sub> um das 6,5-fache ermittelt. Beim Vergleich der LC<sub>50</sub>-Werte im Zusammenhang mit dem DS der AC, lässt sich eine höhere Zellverträglichkeit für AC mit einem niedrigen DS erkennen. Dies konnte bei AC mit EDA-Funktionalisierung, als auch bei AC mit TAEA-Funktionalisierung beobachtet werden. In Bezug auf die funktionelle Gruppe der AC, zeigte sich eine hohe Zellverträglichkeit von AC mit EDA-Funktionalisierung. AC-EDA<sub>0,45</sub> zeigte von allen getesteten AC die höchste Zellverträglichkeit gegenüber HaCaT-Keratinocyten. Bei AC-EDA<sub>0,55</sub> und den AC mit TAEA-Funktionalisierung konnte mit Abnahme der Zellviabilität eine Zunahme an freigesetztem LDH beobachtet werden. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Funktionalität der Zellmembranen der HaCaT-Keratinocyten mit zunehmender AC-Konzentration ebenfalls zunehmend gestört ist.

Das Entzündungspotential von AC wurde anhand der Freisetzung der Zytokine IL-6 und IL-8 untersucht. Die Mengen der Zytokine im Zellkulturüberstand wurden mittels ELISA bestimmt. IL-6 und IL-8 sind proinflammatorische Entzündungsmediatoren und werden u. a. von Keratinocyten

produziert<sup>42,52,93</sup>. In den Zellen liegt im Gegensatz zu IL-6, bereits ohne einen Stimulus zur Zytokinproduktion, regulär eine geringe Menge an IL-8 vor. Infolge eines entsprechenden Stimulus erhöht sich die Expressionrate von IL-8 rapide um das 10- bis 100-fache<sup>42,52</sup>.

Anhand der Ergebnisse zur Freisetzung von IL-8 lässt sich mit zunehmender AC-Konzentration eine Zunahme der Interleukin-Konzentration maximal um das 10-fache (AC-EDA<sub>0,45</sub> und AC mit TAEA-Funktionalisierung) bzw. um das 40-fache (AC-EDA<sub>0,55</sub>) erkennen. Bei den unbehandelten HaCaT-Keratinocyten ist, wie bereits beschrieben, ein Grundlevel an IL-8 nachweisbar. Für AC mit EDA-Funktionalisierung konnten bei den beiden höchsten AC-Konzentrationen jeweils hohe Freisetzungsmengen an IL-6 (100- bis 150-fache Erhöhung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle) in das umgebende Kulturmedium nachgewiesen werden. Bei niedrigeren AC-Konzentrationen war kaum IL-6 nachweisbar. Insbesondere für AC-EDA<sub>0,45</sub> zeigte sich bei den Konzentrationen von 5000 µg/ml und 10000 µg/ml, trotz einer niedrigen Zellviabilität, nur eine maximale zytotoxische Wirkung von 30 %. Wie bereits beschrieben, fiel bei diesen Konzentrationen eine hohe Ausschüttung an IL-6 auf. Dies spricht für hohes Entzündungspotential der AC. Für AC mit TAEA als funktioneller Gruppe konnten vergleichsweise geringe Menge an IL-6 (50-fache Erhöhung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle) nachgewiesen werden. Bereits bei niedrigen Konzentrationen wiesen die AC mit TAEA ein starkes zytotoxisches Potential auf und damit einhergehend waren im Vergleich zu den AC mit EDA nur geringe Mengen des Interleukins nachweisbar.

Für AC-EDA<sub>0,45</sub> konnte eine hohe Zellverträglichkeit bis zu einer Konzentration von 1250 µg/ml nachgewiesen werden, mit einer im Vergleich zu den anderen AC, niedrigen zytotoxischen Wirkung. Der verträgliche Konzentrationsbereich von AC mit TAEA-Funktionalisierung war deutlich geringer, als jener für AC mit EDA-Funktionalisierung. Vermutlich ist diese Beobachtung im Zusammenhang mit der Anzahl an reaktiven Aminogruppen im AC-Molekül begründet. AC mit EDA als funktioneller Gruppen weisen eine reaktive Aminogruppe weniger auf, als AC mit TAEA als funktioneller Gruppe. AC mit TAEA als funktioneller Gruppe wiesen eine niedrigere Zellverträglichkeit auf, da mehr funktionelle Aminogruppen beispielsweise mit negativ-geladenen Zellbestandteilen der HaCaT-Keratinocyten interagieren können.

Die Verteilung der Aminogruppen im AC-Molekül wird über den DS angegeben und zur biologischen Charakterisierung der AC wurden AC mit niedrigem, als auch mit hohem DS gewählt. Es wurde untersucht, ob der unterschiedliche DS einen Einfluss auf die Wirkung der AC zeigt. Diese Vermutung konnte bestätigt werden, da AC mit einem niedrigen DS gegenüber den HaCaT-Keratinocyten verträglicher waren, als AC mit höherem DS. In einer Studie zur Untersuchung der Biokompatibilität von AC mit EDA-Funktionalisierung und unterschiedlichen DS, zeigte sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Zellverträglichkeit von HaCaT-Keratinocyten und dem DS. Für die AC mit dem niedrigsten DS (0,3) konnte die höchste Zellverträglichkeit nachgewiesen werden. Mit zunehmenden DS nahm die Zellverträglichkeit konzentrations- und zeitabhängig ab<sup>37</sup>. Zytotoxische Effekte könnten aufgrund von Interaktionen der positiv-geladenen Aminogruppen mit Bestandteilen

der Zellmembran oder mit denen im Zellinneren hervorgerufen werden und zu Störungen der Membranstruktur und –funktion führen<sup>37,123</sup>. In dem Abschnitt 4.2 wurde bereits die Wirkung von AC am Beispiel von Chitosan versucht zu begründen. Die Möglichkeiten, dass die positiv-geladenen Aminogruppen mit negativ-geladenen Bestandteilen von Zellmembranen interagieren können und es zur Permeabilisierung der Zellen kommt, lassen sich auch auf die Wirkung von AC gegenüber humanen Zellen übertragen. Des Weiteren wäre auch eine Interaktion mit Nukleinsäuren im Inneren der Zellen denkbar. Hierbei könnte u. a. die Synthese neuer Proteine blockiert werden. Dies hätte zur Folge, dass Reparaturmechanismen der Zellen als Reaktion auf Schäden, welche durch AC ausgelöst werden, nicht stattfinden können und die Zellen sterben. Wie bereits beschrieben, sind AC insbesondere bei hohen Konzentrationen in der Lage dichte Filme auf verschiedensten Oberflächen auszubilden. Daher könnten auch die Nährstoffaufnahme und der zelluläre Stoffwechsel zum Erliegen kommen.

Wiegand et al. untersuchten die Wirkung von Chitosan-Derivaten mit unterschiedlichen Molekulargewichten und ähnlichem Deacetylierungsgrad auf HaCaT-Keratinocyten. Das Chitosan-Derivat mit hohem Molekulargewicht zeigte einen stärkeren antiproliferativen Effekt auf die Keratinocyten, als das Chitosan-Derivat mit einem niedrigeren Molekulargewicht<sup>123</sup>. He et al. beschrieben für Chitosan und Chitosan-Derivate Effekte auf HaCaT-Keratinocyten und auf das Stratum corneum muriner Haut. Bei HaCaT-Keratinocyten führte die Inkubation mit Chitosanen zu Beeinträchtigungen des Membranpotentials und der Membranfluidität. Im Stratum corneum wurden Änderungen in der Sekundärstruktur von Keratin, als auch eine Abnahme des Wassergehalts beobachtet<sup>45</sup>.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Analyse der HaCaT-Keratinocyten nach 24-stündiger Inkubation mit AC, bestätigten die Ergebnisse der Viabilitätsuntersuchung und den daraus ermittelten LC<sub>50</sub>-Werten. Für AC-EDA<sub>0,45</sub> wurde beispielsweise ein LC<sub>50</sub> von rund 2760 µg/ml ermittelt. Bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigte sich bei einer AC-Konzentration von 2500 µg/ml eine Abnahme der HaCaT-Zelldichte um ca. 50 %, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Übereinstimmung zwischen LC<sub>50</sub> und den dazu entsprechenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigte sich ebenfalls bei den anderen AC.

#### 4.4 Biokompatibilitätsindex von AC

Die Biofunktionalität und die Biokompatibilität der AC wurden in dieser Arbeit ausführlich betrachtet. Eine Vielzahl von veröffentlichten Studien von antimikrobiellen Substanzen verweisen entweder nur auf die antimikrobielle Wirkung oder nur auf deren Zytotoxizität<sup>122</sup>. Doch wie bereits von Wiegand et al. beschrieben, ist die Etablierung eines BI notwendig, um einen Vergleich von antimikrobiellen Substanzen entsprechend der antimikrobiellen Wirksamkeit und der Biokompatibilität zu ermöglichen<sup>121</sup>. Im Abschnitt 1.4 wurde bereits erwähnt, dass Müller und Kramer einen BI

definierten, welcher sich anhand der Konzentration, bei der 50 % der untersuchten Mausfibroblasten infolge der Inkubation mit silberhaltigen Wundantiseptika geschädigt sind, und der Reduktion des bakteriellen Wachstums von *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* um mindestens fünf log-Stufen, berechnet <sup>82</sup>.

In einer dieser Arbeit vorausgegangenen Veröffentlichung wurde ein BI definiert, welcher zum Vergleich der Biokompatibilität von AC in einem 2d-HaCaT-Keratinocytenmodell und der Biofunktionalität gegenüber den Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella pneumoniae* Anwendung fand <sup>37</sup>. Dieser BI berechnet sich anhand des Verhältnisses von  $LC_{50}$  zu  $IC_{50}$ . Eine antimikrobielle Substanz mit einem  $BI > 1$  erweist sich aufgrund einer hohen antimikrobiellen Wirksamkeit und einer hohen Zellverträglichkeit als biokompatibel.

Zur Berechnung der jeweiligen BI wurden die  $LC_{50}$  und  $IC_{50}$ -Werten nach 24-stündiger Inkubation der HaCaT-Keratinocyten bzw. *C. albicans* mit den jeweiligen AC verwendet. Für HaCaT-Keratinocyten konnten zwar nach 48 h  $LC_{50}$ -Werte berechnet werden, doch nach dieser Inkubationszeit ist bei *C. albicans* kein mikrobielles Wachstum nachweisbar.

Für AC mit EDA-Funktionalisierung konnte die Biokompatibilität anhand der BI (AC-EDA<sub>0,45</sub>: 4,01 und AC-EDA<sub>0,55</sub>: 2,61) bestätigt werden. Hierbei konnte eine Abhängigkeit vom DS der AC beobachtet werden. Der berechnete BI für AC-EDA mit einem DS von 0,45 war um das 1,5-fache höher, als für die AC mit gleicher funktioneller Gruppe, aber höherem DS (0,55).

Obwohl AC mit TAEA-Funktionalisierung eine bessere antimikrobielle Wirkung (niedrigere  $IC_{50}$ -Werte) aufwiesen, als AC mit EDA-Funktionalisierung, war die Zellverträglichkeit wesentlich schlechter. Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte für AC mit TAEA als funktioneller Gruppe waren 7- (AC-TAEA<sub>0,35</sub>) bzw. 14-fach (AC-TAEA<sub>0,56</sub>) höher als die entsprechenden  $LC_{50}$ -Werte. Daher konnte keine Biokompatibilität für diese AC nachgewiesen werden.

## 4.5 Wirkung von AC in Co-Kulturmodellen

Mit dieser Arbeit wurde erstmals die Wirkung der AC *in-vitro* mit Co-Kulturmodellen aus humanen Zellen und Mikroorganismen, als auch die Wirkung der AC in *Candida*-infizierten 3d-Hautmodellen unter *in-vivo*-ähnlichen Bedingungen ermittelt.

HaCaT-Keratinocyten wurden in den 2d-Co-Kulturmodellen mit den zwei unterschiedlichen *C. albicans*-Stämmen DSM 1386 und ATCC MYA-2876 co-kultiviert. Der nicht-invasiv wachsende *C. albicans*-Stamm DSM 1386 zeigte nach 24-stündiger Inkubation nur minimale Einflüsse auf die Viabilität von HaCaT-Keratinocyten. Nach 48 h Co-Kultivierung wurde ein Rückgang der HaCaT-Zellviabilität um 20 % bis 30 % analysiert. Deutlich negativere Effekte auf die Viabilität der humanen Zellen konnten bei der Co-Kultivierung mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 bereits nach 24 h gezeigt werden. Hierbei konnte keine Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL-1 $\alpha$ , IL-6 und IL-8 in das umgebende Zellkulturmedium mittels ELISA quantifiziert werden.

Bei der Behandlung der Co-Kulturmodelle mit AC konnte bei der Inkubation der HaCaT-Keratinocyten mit *C. albicans* DSM 1386 im Vergleich zu nicht-infizierten HaCaT-Keratinocyten bei hohen AC-Konzentrationen stärkere zytotoxische Effekte beobachtet werden. Die Effekte verstärkten sich nach 48-stündiger Co-Kultivierung. Bei Co-Kulturmodellen mit *C. albicans* ATCC MYA-2876, welche mit AC behandelt wurden, konnten keine konzentrations- und zeitabhängigen Effekte beobachtet werden. Die Zellschädigungen der HaCaT-Keratinocyten durch *C. albicans* ATCC MYA-2876 waren so massiv, dass keine Unterschiede erkennbar waren. Abgesehen von den negativen Effekten durch den invasiv-wachsenden *Candida*-Stamm, zeigte AC-EDA<sub>0,45</sub> in den Co-Kulturmodellen mit *C. albicans* DSM 1386 die höchste Zellverträglichkeit, gefolgt von AC-EDA<sub>0,55</sub>, AC-TAEA<sub>0,35</sub> und AC-TAEA<sub>0,56</sub>. Dabei war der zellverträgliche AC-Konzentrationsbereich für AC mit EDA-Funktionalisierung deutlich höher, als für AC mit TAEA-Funktionalisierung. Die Abstufung der Zellverträglichkeit der AC in den Co-Kulturmodellen mit *C. albicans* DSM 1386 entspricht den Ergebnissen der nicht mit *Candida*-infizierten HaCaT-Keratinocyten. Auch bei der Freisetzung von Interleukinen bei den beiden höchsten AC-Konzentrationen gab es Übereinstimmungen.

Die antimikrobielle Wirkung der AC in den 2d-Co-Kulturmodellen auf die beiden *Candida*-Stämme konnte nur mittels qPCR analysiert werden, da die biochemische Methode anhand der Bestimmung des mikrobiellen ATP-Gehalts aufgrund des Vorhandenseins von humanen Zellen an ihre Grenze gestoßen ist. Mithilfe spezifischer Primer konnten jedoch *C. albicans*-Zellen in der qPCR quantifiziert werden. Beim Vergleich der qPCR-Ergebnisse war im Allgemeinen bei den Co-Kulturmodellen nach 24 h eine stärkere Reduktion von *C. albicans* DSM 1386 durch AC erkennbar, als für *C. albicans* ATCC MYA-2876. Dabei war ein konzentrationsabhängiger Effekt zu erkennen. Die Reduktion der mikrobiellen Zellen war nach 48-stündiger Inkubation mit AC geringer, als nach 24 h. Es konnte bereits nach 24 h eine antimikrobielle Wirkung der AC gezeigt werden, sodass nach 48 h die Zellzahl an *C. albicans* bereits reduziert war.

Entsprechend der Japanischen Standardmessmethode JIS L 1902 zur Beurteilung der antimikrobiellen Wirkung entspricht eine logarithmische Reduktion des mikrobiellen Wachstums von 0,5 bis 1 einer geringen antimikrobiellen Wirkung, Werte zwischen 1 und 3 entsprechen einer signifikanten antimikrobieller Wirkung und Werte größer 3 entsprechen einer starken antimikrobiellen Wirkung<sup>58</sup>.

AC-TAEA<sub>0,56</sub> zeigte den stärksten antimikrobiellen Einfluss auf *C. albicans*. Hierbei konnte nach 24-stündiger Inkubation bei einer AC-Konzentration von 156 µg/ml eine maximale Reduktion um fünf log-Stufen gezeigt werden. Dies entspricht einer starken antimikrobiellen Wirkung. Bereits eine Konzentration von 10 µg/ml dieser AC zeigte nach 24 h gegenüber *C. albicans* ATCC MYA-2876 eine signifikante antimikrobielle Wirkung und gegenüber *C. albicans* DSM 1386 eine starke antimikrobielle Wirkung. Des Weiteren konnte nur für AC-TAEA<sub>0,35</sub> nach 24-stündiger Inkubation gegenüber *C. albicans* ATCC MYA-2876 bei einer AC-Konzentration von 39 µg/ml eine signifikante und bei 156 µg/ml eine starke antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden. AC mit EDA-Funktionalisierung zeigten entsprechend der JIS L 1902 gegenüber dem invasiven *Candida*-Stamm

keine antimikrobielle Wirkung. Gegenüber *C. albicans* DSM 1386 zeigte AC-TAEA<sub>0,35</sub> nach 24 h ab einer AC-Konzentration von 39 µg/ml eine starke antimikrobielle Wirkung. Mit AC-EDA<sub>0,55</sub> konnte in diesem Zusammenhang nur eine signifikante antimikrobielle Wirkung gezeigt werden. Und AC-EDA<sub>0,45</sub> zeigte erst ab einer AC-Konzentration von 2500 µg/ml eine signifikante Wirkung gegenüber *C. albicans* DSM 1386. Die Ergebnisse dieser Untersuchung bezüglich der antimikrobiellen Wirkung von AC in 2d-Co-Kulturmodellen bestätigen die Ergebnisse der antimikrobiellen Untersuchung gegenüber *C. albicans* DSM 1386 ohne eine Co-Kultivierung mit HaCaT-Keratinocyten. Jedoch konnten bei der Charakterisierung der antimikrobiellen Wirksamkeit der AC gegenüber *C. albicans* für beide Stämme anhand der Untersuchungsmethoden keine Unterschiede in der antimikrobiellen Wirkung gezeigt werden. Darin unterscheiden sich die Ergebnisse der Charakterisierung der Biofunktionalität von der antimikrobiellen Wirkung in den Co-Kulturmodellen. Mit den Ergebnissen konnte aber auch gezeigt werden, dass AC auch in komplexeren Modellen ihre antimikrobielle Wirksamkeit nicht verlieren.

Die Beobachtung, dass *C. albicans* ATCC MYA-2876 im Vergleich zu *C. albicans* DSM 1386 in den Co-Kulturmodellen mit Hilfe von AC schlechter zu reduzieren waren, ist vermutlich im unterschiedlichen Wachstumsverhalten der beiden *Candida*-Stämme begründet. Der invasiv-wachsende *Candida*-Stamm ATCC MYA-2876 ist in der Lage als Hyphe zwischen bzw. in HaCaT-Keratinocyten zu wachsen, dies erschwert AC den Zugang zu den mikrobiellen Zellen. Während *C. albicans* DSM 1386 als Blastosporen einen guten Angriffspunkt für AC darstellen.

Während die Untersuchungen in den 2d-Co-Kulturmodellen in Hinblick auf die Verträglichkeit der AC auf humane Zellen an HaCaT-Keratinocyten durchgeführt worden, wurden bei den 3d-Hautmodellen zur Herstellung der Epidermis anstelle von HaCaT-Keratinocyten die primäre Zellen NHEK verwendet. Bei der Etablierung dieser Hautmodelle zeigte sich, dass primäre Zellen besser geeignet sind, als Zelllinien. Mit NHEK war der epidermale Aufbau dieser Hautmodelle mit dem Aufbau der Epidermis humaner Haut vergleichbarer, als mit HaCaT-Keratinocyten<sup>38</sup>.

In einem rekonstruierten Hautäquivalent mit HaCaT-Keratinocyten stellten Boelsma et al. eine abnormale Expression der Keratine K4, K13 und K19 fest, welche weder in humaner Haut, noch in einem rekonstruierten Hautäquivalent mit normalen humanen Keratinocyten exprimiert wurden<sup>9</sup>.

In dieser Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf *Candida*-Infektionen der Haut gerichtet. In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Studien über die Interaktion von *Candida* spp. mit unverhornten Epithelien, wie beispielsweise der Mundhöhle, des Gastrointestinaltrakts oder der Vagina. Bisher ist wenig über die Interaktion von *Candida* spp. mit der Haut publiziert. Dies stellten auch Kühbacher et al. fest und gaben einen Überblick über die Pathogenese von *Candida* auf der Haut, als auch über die Abwehrmechanismen gegen *C. albicans* in diesem Zusammenhang. Durch *Candida* verursachte Infektionen der Haut treten häufig in Verbindung mit Atopischer Dermatitis und Psoriasis, als auch bei Neugeborenen in Form von Windeldermatitis, sowie infolge anderer physikalischer und

immunologischer Störungen der Hautbarriere auf. Bei gesunder Haut bildet die äußerste Schicht aus abgestorbenen Keratinozyten eine aktive Barriere gegen *Candida*, welche nur durch aktive Penetration in Form von Hyphen durchbrochen werden kann <sup>71</sup>. Bei einer Interaktion von Epithelzellen mit *C. albicans* werden die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) freigesetzt <sup>21,94,98,99,108,111</sup>. Weiterhin kommt es zur Ausschüttung antimikrobieller Peptide (AMP), wie Defensinen, Cathelicidin (LL-37) und Histatinen <sup>66,71</sup>.

Für den *C. albicans*-Stamm DSM 1386 konnte in einem rekonstruierten Modell eines humanen oralen Epithels, als auch in einem Modell einer oralen Candidose gezeigt werden, dass dieser *Candida*-Stamm nicht-invasiv in dieses Modellsysteme wuchs und eine geringe Virulenz aufwies. Dahingegen konnte für den *C. albicans*-Stamm ATCC MYA-2876 ein invasives Wachstum, als auch eine hohe Virulenz gezeigt werden <sup>4,112</sup>. Ähnliche Beobachtungen, im Zusammenhang zwischen einem invasiven und nicht-invasiven Wachstum beider *Candida*-Stämme in einem rekonstruierten Modell eines humanen oralen Epithels, wurden von Thewes et al. publiziert <sup>112</sup>.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnten anhand der mikroskopischen Analyse von *Candida*-infizierten 3d-Hautmodellen gezeigt werden, dass *C. albicans* ATCC MYA-2786 invasiv in Epidermis und Dermis wächst. Im Gegensatz konnte für *C. albicans* DSM 1386 nur eine Adhäsion der Hefezellen an die Epidermis der 3d-Hautmodelle beobachtet werden und keine Penetration in die Hautmodelle. Das invasive Wachstum von *C. albicans* ATCC MYA-2786 führte bei den Hautmodellen zu einer erhöhten Freisetzung von LDH und proinflammatorischer Zytokine. Nach 24-stündiger Inkubation der Hautmodelle mit dem invasiven *C. albicans*-Stamm konnte ein zytotoxisches Potential von 60 % bzw. nach 48 h von 95 % nachgewiesen werden. Eine hohe Freisetzung an LDH in das umgebende Kulturmedium ist ein Anzeichen für eine massive Schädigung der humanen Hautzellen. Die Inkubation der Hautmodelle mit *C. albicans* DSM 1386 zeigte anhand der biochemischen Analysen keine toxische, als auch inflammatorische Wirkung auf die Zellen in den Hautmodellen.

Im Gegensatz zu den 2d-Co-Kulturmodellen wurde bei den 3d-Hautmodellen jeweils nur eine AC-Konzentration getestet. Die Hautmodelle wurden jeweils mit der 1%-igen AC-Stammlösung, ohne und nach Infektion der Hautmodelle mit den beiden *Candida*-Stämmen, behandelt.

Bei Hautmodellen, welche mit AC inkubiert wurden, zeigten sich nach Anfärbung mit HE zusammenhängende pinke Schichten auf deren Oberflächen. Diese Schicht war bei Hautmodellen, welche mit AC mit niedrigem DS inkubiert wurden, dünner ausgeprägt, als bei Hautmodellen, welche mit AC mit hohem DS inkubiert wurden. Nach 48-stündiger Inkubation der Hautmodelle mit AC waren die Schichten jeweils stärker ausgebildet. Bei der pinken Schicht lässt sich vermuten, dass es sich hierbei um AC handelt. Die Ausbildung von transparenten AC-Filmen wurde bereits unter Kapitel 4.2 beschrieben. Die HE-Färbung dient in der Histologie zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Gewebestrukturen. Dieser histologische Nachweis beruht auf zwei Einzelfärbungen. Hämatoxylin



färbt alle sauren Zellbestandteile, wie Zellkerne, blau. Eosin weist eine negative Ladung auf und färbt basische Strukturen rot an. Gurr beschrieb eine geringe Affinität von Eosin gegenüber Cellulose<sup>43</sup>. Daher ist eine Interaktion zwischen Eosin und den basischen AC-Lösungen denkbar. Diese Reaktion ist in den mikroskopischen Bildern anhand eines dichten, pink-angefärbten AC-Film auf der Oberfläche der Hautmodelle zu erkennen.

Mit der höchstmöglichen AC-Konzentration konnte eine Infektion der Hautmodelle mit dem *Candida*-Stamm ATCC MYA-2876 nicht verhindert werden. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen von Hautmodellen, welche mit *C. albicans* DSM 1386 infiziert und anschließend mit AC-TAEA<sub>0,35</sub> (24 h) und AC-TAEA<sub>0,56</sub> (24 h und 48 h) behandelt wurden, sind weder Blastosporen noch Hyphen auf bzw. in den Hautmodellen zu erkennen. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass AC mit TAEA-Funktionalisierung eine Besiedlung der Hautmodelle mit dem nicht-invasiv wachsenden *Candida*-Stamm verhindern können.

Nach der histologischen Präparation konnte bei mikroskopischen Aufnahmen von Hautmodellen, welche mit dem invasiven *Candida*-Stamm infiziert und anschließend mit AC behandelt wurden, kein Unterschied zu den nicht mit AC-behandelten Hautmodellen festgestellt werden. Nach 24-stündiger Inkubation waren Hyphen von *C. albicans* ATCC MYA-2876 bis in die Dermis vorgedrungen. Das Hyphengeflecht war nach 48-stündiger Inkubation dichter und die Hautmodelle waren zum Teil komplett von *C. albicans* ATCC MYA-2876 durchwachsen.

Betrachtet man im Vergleich zu den mikroskopischen Aufnahmen die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen, lassen sich Unterschiede im zytotoxischen Potential der AC erkennen. Unabhängig von der Co-Kultivierung der Hautmodelle mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 zeigten sich für AC mit TAEA als funktioneller Gruppe hohe zytotoxische Potentiale. Für Hautmodelle, welche mit AC mit EDA-Funktionalisierung behandelt wurden, zeigte sich ein maximales zytotoxisches Potential von 30 % nach 48-stündiger Inkubation der Hautmodelle mit AC-EDA<sub>0,55</sub>.

Es wurde eine Immunstimulation der Keratinozyten und Fibroblasten in den Hautmodellen nach Infektion mit beiden *Candida*-Stämmen und/oder der Behandlung mit AC auf Proteinebene anhand der Freisetzung der Interleukine IL-6, IL-8 und IL-1 $\alpha$  mittels ELISA nachgewiesen. Mit der RT-qPCR wurde eine Immunstimulation der Hautzellen auf Grundlage der Genexpression von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-18 untersucht.

IL-1 $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin und wird im Stratum corneum eingelagert. Infolge einer Schädigung der Hautbarriere wird die Freisetzung von IL-1 $\alpha$  ausgelöst. Dies bewirkt die Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8<sup>62,119</sup>. Da die Freisetzung von IL-1 $\alpha$  die erste Reaktion auf eine Schädigung ist, ist dieses Zytokin mittels ELISA nachweisbar. Im Gegensatz dazu war eine Expression von IL-1 $\alpha$  mittels RT-qPCR nicht mehr bestimmbar, da nach 24 h und 48 h keine Produktion und folglich keine Expression von IL-1 $\alpha$  stattfand. Dieses Interleukin ist der Hauptinitiator einer Entzündungsreaktion und die Produktion wird bereits früh induziert<sup>17,38</sup>. IL-6 wird in vielen Zelltypen produziert, dazu

zählen u. a. Keratinozyten und Fibroblasten. Dieses Interleukin spielt eine zentrale Rolle bei Abwehrreaktionen und Verletzungen und wird erst nach einem entsprechenden Stimulus von den Zellen produziert<sup>42,93</sup>. Als wesentlicher Entzündungsmarker löst IL-6 in Keratinozyten die Proliferation zum Schutz der Haut aus<sup>17</sup>. Die Expression des Chemokins IL-8 ist ähnlich zur der von IL-6 und es wird ebenfalls von verschiedenen Zellen produziert. In gesunden, nicht-stimulierten Zellen ist IL-8 kaum nachweisbar, aber infolge eines Stimulus durch ein proinflammatorisches Zytokins kann die Expressionsrate schnell um das 10- bis 100-fache zunehmen<sup>52</sup>. Die Produktion von IL-8 ist maßgeblich für die Proliferation und Regeneration von Keratinozyten<sup>68</sup>. Im Gegensatz zu anderen Interleukinen kann IL-8 neutrophile Granulozyten aktivieren. IL-18 wird ebenfalls infolge einer mikrobiellen Infektion von Keratinozyten gebildet und stimuliert die Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-12<sup>111</sup>.

Anhand der Ergebnisse der ELISA-Analysen wurden bei Hautmodellen, welche mit AC mit TAEA-Funktionalisierung inkubiert wurden, höhere Freisetzungsmengen der Interleukine IL-6, IL-8 und IL-1 $\alpha$  nachgewiesen, als für Hautmodelle, welche mit EDA-AC behandelt wurden. Diese Beobachtung trifft auch auf die Infektion der Hautmodelle mit *C. albicans* und der sich anschließenden Behandlung mit AC mit TAEA-Funktionalisierung zu. Mit diesen Ergebnissen kann die Biokompatibilität von AC mit EDA-Funktionalisierung bestätigt werden. AC mit TAEA-Funktionalisierung sind, wie in 2d-Kulturmodellen, auch in 3d-Hautmodellen schlecht verträglich. Die Ergebnisse der RT-qPCR zeigten vor allem nach der Infektion der Hautmodelle mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 und nach Behandlung mit AC-EDA<sub>0,55</sub> eine erhöhte Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 und lassen auf das Auslösen einer Entzündungsreaktion schließen.

Als Kontrolle für eine Schädigung der Hautmodelle wurde SDS verwendet. Dieses Tensid weist eine denaturierende Wirkung auf Proteine auf. Bei den Hautmodellen wurde eine 0,5 %-ige SDS-Lösung direkt auf die Epidermis aufgebracht. Dies hat zur Folge, dass die Proteinstruktur zwischen den Keratinozyten denaturiert und die Hautbarriere destabilisiert wird<sup>56,116</sup>. In den mikroskopischen Bildern waren nach 24-stündiger Inkubation mit SDS eine beginnende Ablösung der Epidermis von der Dermis und eine Auflockerung der Epidermisschichten erkennbar. Nach 48 h war eine komplette Ablösung der Epidermis von der Dermis erkennbar. Die denaturierende Wirkung und Störung der Hautbarriere durch SDS lösen Entzündungsreaktionen aus. Diese führen zu einer erhöhten Freisetzung von LDH und verschiedenen Entzündungsmediatoren. Die erhaltenen Werte für SDS wurden als Positiv-Kontrolle bei der Analyse mittels ELISA 100 % gleichgesetzt und die Ergebnisse der AC und der Infektion mit *C. albicans* DSM 1386 und *C. albicans* ATCCMYA-2876 wurden auf diesen Wert bezogen. Die ermittelten Werte für die Positiv-Kontrolle zeigen nur die Schädigung durch SDS an, daher sind vergleichsweise höhere Werten bei der Auswertung der Ergebnisse nach Inkubation mit AC und/oder mit *C. albicans* möglich. Bei den Hautmodellen, welche mit dem invasiv-wachsendem *Candida*-Stamm inkubiert wurden, konnten nach 48 h mittels ELISA höhere Freisetzungsmengen an IL-6 und IL-1 $\alpha$  im Vergleich zur Positiv-Kontrolle bestimmt werden. Auch bei den Ergebnissen der

RT-qPCR waren bei den mit *C. albicans* ATCC MYA-2876-infizierten Hautmodellen nach 24 h und 48 h im Vergleich zur Positiv-Kontrolle höhere Expressionsraten von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 nachweisbar. Diese Beobachtungen deuten eine massive Schädigung der humanen Zellen an. Die Freisetzung und Produktion von Zytokinen kann neben einer Reaktion auf einen chemischen Reiz auch infolge einer Reaktion auf Mikroorganismen ausgelöst werden.

Bei 3d-Hautmodellen, welche mit dem nicht-invasiv wachsendem *Candida*-Stamm DSM 1386 co-kultiviert wurden, zeigten sich anhand der ELISA- und qPCR-Ergebnisse vergleichsweise zu den Ergebnissen für Hautmodelle, welche mit der Positiv-Kontrolle bzw. dem invasiv-wachsendem *Candida*-Stamm ATCC MYA-2876 inkubiert wurden, nur geringe Freisetzungsmengen bzw. niedrige Expressionsraten von Interleukinen. Diese Ergebnisse bestätigten, das nicht-invasive und damit nicht zellschädigende Wachstumsverhalten von *C. albicans* DSM 1386.

Neben der proinflammatorischen Zytokinantwort und dem Nachweis auf Zellschädigung mittels LDH kann die Reaktion der humanen Zellen auf die Adhäsion und Invasion von *C. albicans* auch anhand von AMP analysiert werden. Unter den AMP weisen hBD-3 und LL-37 eine antimikrobielle Wirkung auf *C. albicans* auf<sup>71,118</sup>. Keratinozyten zeigen eine aktive Beteiligung an der angeborenen Immunantwort durch die Bildung von Zytokinen, Chemokinen und AMP<sup>115</sup>. Sie lagern Vorstufen und aktive Formen von AMP in intrazellulären Vesikeln ein, sodass infolge des Kontakts mit einem Pathogen eine schnelle Abwehrreaktion stattfinden kann<sup>110</sup>. Die Expression von hBD-3 wird u. a. durch proinflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stimuliert<sup>115</sup>. Die Expression von LL-37 wird durch IL-18 induziert<sup>66</sup>.

Anhand der Ergebnisse der RT-qPCR konnten nach 48-stündiger Inkubation der Hautmodelle mit dem *Candida*-Stamm ATCC MYA-2876, im Vergleich zu den Werten nach 24-stündiger Inkubationszeit, eine erhöhte Expression von hBD-3 gezeigt werden. Auch nach zusätzlicher Behandlung der Hautmodelle mit AC-EDA<sub>0,55</sub> konnte nach 48 h eine erhöhte Expression des humanen Defensins beobachtet werden. Für diese Hautmodelle war 24 h nach der Infektion eine erhöhte Expression der Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 zu erkennen. Die erhöhten Expressionsraten an IL-6 und IL-8 sprechen für das Auslösen einer Entzündungsreaktion. Die erhöhte Expression von IL-1 $\beta$  stimulierte vermutlich die Hautzellen zur Produktion von hBD-3. Diese Stimulation dient zur aktiven Abwehr von *C. albicans* ATCC MYA-2876. Daher war nach 48 h eine erhöhte Expression des humanen Defensins nachweisbar. Bei den Hautmodellen, welche nach der Infektion mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 mit AC-EDA<sub>0,45</sub> behandelt wurden, war keine Expression von IL-1 $\beta$  mittels RT-qPCR nachweisbar. Demzufolge konnte nach 48 h keine Expression von hBD-3 gezeigt werden.

Im Gegensatz konnte nach der Infektion der Hautmodelle mit dem nicht-invasiv wachsendem *Candida*-Stamm DSM 1386 keine Expression von Entzündungsmediatoren und AMP gezeigt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die aktive Reaktion der Hautzellen auf die zellschädigende Wirkung aufgrund des invasiven Wachstums von *C. albicans* ATCC MYA-2876. Jedoch konnte nach 48-stündiger Inkubation der Hautmodelle mit *C. albicans* DSM 1386 und Behandlung mit AC-EDA<sub>0,55</sub>

eine Expression von LL-37 und hBD-3 mittels RT-qPCR gezeigt werden. Dieses Ergebnis ist widersprüchlich zu den Beobachtungen mit *C. albicans* ATCC MYA-2876. Da nach 24-stündiger Inkubation der Hautmodelle mit *C. albicans* DSM 1386 und AC-EDA<sub>0,55</sub> keine Expression von IL-1 $\beta$  (zur Stimulation der Expression von hBD-3) und IL-18 (zur Stimulation der Expression von LL-37) nachgewiesen werden konnte. Anhand der mikroskopischen Bilder dieser Hautmodelle lassen sich vermutlich diese Ergebnisse bestätigen, da nur bei diesen Aufnahmen *C. albicans* DSM 1386 in die Dermis vorgedrungen ist. Jedoch konzentriert sich der Befall der Hautmodelle durch *C. albicans* DSM 1386 auf einen abgrenzbaren Bereich. Bei *C. albicans* ATCC MYA-2876 war vergleichsweise keine Abgrenzung der Invasion erkennbar und eine deutliche Ausbildung eines massiven Hyphengeflechts, welches bei der Infektion der Hautmodelle durch *C. albicans* DSM 1386 nicht erkennbar war. Hyphen von *C. albicans* repräsentieren im Gegensatz zu Blastosporen die überwiegende Form der Invasion und der schädigenden Wirkung auf Gewebe. Blastosporen sind meist nur auf der Oberfläche von Epithelien zu finden. Zudem unterscheidet sich die Immunantwort auf die unterschiedlichen Wachstumsformen von *C. albicans*. Im Gegensatz zu Hyphen weisen Blastosporen an den Sprossungsnarben hohe Expositionen von  $\beta$ -Glukanen auf, welche nur in geringer Konzentration bei Hyphen zu finden sind. Dies führt bei humanen Zellen zu unterschiedlichen Erkennungsmechanismen und zu unterschiedlichen Zytokinstimulationen <sup>41</sup>. Bei den verwendeten Hautmodellen handelt es sich um vereinfachte Modelle menschlicher Haut. Im Vergleich zu humaner Haut ist zwar ein ähnlicher Aufbau bei diesen Hautmodellen erkennbar, jedoch fehlen diesen Hautmodellen weitere Zelltypen. In humaner Haut sind neben Keratinozyten und Fibroblasten Langerhanszellen, Melanozyten, Fettzellen, Haare, Muskeln, Blutgefäße, Nerven sowie Talg- und Schweißdrüsen zu finden <sup>72,80,126</sup>. Mit den 3d-Hautmodellen waren aufgrund des komplexen Aufbaus mit einer externen Barriere *in-vivo*-ähnlichere Rückschlüsse auf die Wirkung von AC möglich, als mit den 2d-Kulturmodellen. Obwohl es sich bei dem gewählten 3d-Modell um ein vereinfachtes Organmodell handelt, welches vom kompletten Organismus Mensch losgelöst ist, sind die, in diesem Modellsystem vorhandenen Zelltypen in der Lage Immunreaktionen auszulösen. Mittels ELISA konnte eine Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen gezeigt werden. Die Expressionsanalysen mittels RT-qPCR deuteten auf eine aktive Synthese von Interleukinen, als auch von AMP hin. Bei diesen Hautmodellen konnte eine Infektion mit dem invasiv-wachsendem *C. albicans* Stamm ATCC MYA-2876 nicht verhindert werden. In der Literatur wird für 3d-Modelle, welche nur aus dermalen Fibroblasten und Keratinozyten aufgebaut sind, eine tiefe Penetration durch *C. albicans* beschrieben. Mit einem Hautmodell, welches neben Keratinozyten und Fibroblasten in einer Kollagenmatrix zusätzlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen als zelluläre Komponente aufwies, konnte eine schützende Wirkung vor *Candida*-Infektionen gezeigt werden <sup>72</sup>. Auch bei Weindl et al. konnten bei einem rekonstruierten Modell humaner epithelialer Zellen unter Zugabe von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten die Epithelzellen vor *Candida*-Infektionen geschützt werden <sup>117</sup>.

## 5. AUSBLICK

Das Potential der AC-Forschung ist mit Hinblick auf die Anwendung am Menschen, beispielsweise zur Behandlung von *Candida*-Infektionen, noch längst nicht ausgeschöpft. Obwohl bereits seit drei Jahrzehnten mit AC geforscht wird, ist bisher wenig über deren biologische Eigenschaften und somit über potentielle medizinische Anwendungsmöglichkeiten bekannt. Mit der vorliegenden Arbeit wurden erstmals umfassend grundlegende Erkenntnisse über die biologischen Eigenschaften der AC in 2d- und 3d-Co-Kulturmodellen und anhand von mikroskopischen Aufnahmen gewonnen.

Mit Hinblick auf eine medizinische Anwendung zeigen AC mit EDA-Funktionalisierung und niedrigen DS-Werten ( $\leq 0,55$ ) eine hohe Biokompatibilität. AC mit TAEA-Funktionalisierung zeigen zwar eine bessere antimikrobielle Wirkung, als AC mit EDA-Funktionalisierung, jedoch keine Biokompatibilität. Auch Zieger et al. konnten in einer Studie zur Hämkompatibilität von AC gegenüber humanen Blut eine bessere Verträglichkeit von AC mit EDA-Funktionalisierung und einem  $DS \leq 0,5$  zeigen<sup>127</sup>. Neben einer antifungalen Wirkung gegenüber *C. albicans* wurde auch eine antibakterielle Wirkung von AC in einer früheren Studie bestätigt<sup>37</sup>.

In Verbindung mit dem antimikrobiellen Charakter und der Eigenschaft von AC auf abiotischen, als auch auf biotischen Oberflächen dichte Filme auszubilden, bilden eine Grundlage für weitere Untersuchungen hinsichtlich der antimikrobiellen Beschichtung von verschiedensten Oberflächen.

In den letzten Jahren eröffnete die Erforschung von Nanopartikeln neue Wege in der Charakterisierung und Anwendung von AC im medizinischen Bereich. Auf Grundlage der Ergebnisse von Nikolajski et al. ist eine Verwendung von AC in Form von Nanopartikel, gekoppelt mit Farbstoffen im medizinischen Bereich als Nachweismethode denkbar<sup>84</sup>.

## LITERATURVERZEICHNIS

- 1 **Antoni, D.; Burckel, H.; Josset, E. und Noel, G.** *Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo*. International Journal of Molecular Sciences 16, 5517-5527, doi:10.3390/ijms16035517 (2015).
- 2 **Backinowski, L. V.; Tarchevsky, I. A.; Chlenov, M. A. und Marchenko, G. N.** *Cellulose: Biosynthesis and Structure*. Springer Berlin Heidelberg (2013).
- 3 **Balan, V. und Verestiuc, L.** *Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review*. European Polymer Journal 53, 171-188, doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.01.033 (2014).
- 4 **Bartie, K. L.; Williams, D. W.; Wilson, M. J.; Potts, A. J. C. und Lewis, M. A. O.** *Differential invasion of Candida albicans isolates in an in vitro model of oral candidosis*. Oral Microbiology and Immunology 19, 293-296, doi:10.1111/j.1399-302X.2004.00155.x (2004).
- 5 **Battista, O. A. und Smith, P. A.** *Microcrystalline Cellulose*. Industrial & Engineering Chemistry 54, 20-29, doi:10.1021/ie50633a003 (1962).
- 6 **Bellich, B.; D'Agostino, I.; Semeraro, S.; Gamini, A. und Cesàro, A.** *"The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans*. Marine Drugs 14, 99, doi:10.3390/md14050099 (2016).
- 7 **Berlin, P.; Klemm, D.; Jung, A.; Liebegott, H.; Rieseler, R. und Tiller, J.** *Film-Forming Aminocellulose Derivatives as Enzyme-Compatible Support Matrices for Biosensor Developments*. Cellulose 10, 343-367, doi:10.1023/A:1027342027945 (2003).
- 8 **Bieser, A. M. und Tiller, J. C.** *Mechanistic Considerations on Contact-Active Antimicrobial Surfaces with Controlled Functional Group Densities*. Macromolecular Bioscience 11, 526-534, doi:10.1002/mabi.201000398 (2011).
- 9 **Boelsma, E.; Verhoeven, M. C. und Poncet, M.** *Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT)*. Journal of Investigative Dermatology 112, 489-498, doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00545.x (1999).
- 10 **Boukamp, P.; Petrussevska, R. T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A. und Fusenig, N. E.** *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. The Journal of cell biology 106, 761-771 (1988).
- 11 **Brand, L. und Grimm, V.** *Dreidimensionale Zellkulturmodelle*. future technologies update, Zukünftige Technologien Consulting, VDI Technologiezentrum GmbH, Düsseldorf, (2009).
- 12 **Braut-Boucher, F.; Pichon, J.; Wantyghem, J.; Muriel, M. P.; Giner, M.; Font, J. und Aubery, M.** *Human keratinocyte models: Assessment of cell adhesion and dermatotoxicity using fluorescent probes*. Toxicology in Vitro 11, 601-611, doi:10.1016/S0887-2333(97)00067-2 (1997).
- 13 **Brohem, C. A.; da Silva Cardeal, L. B.; Tiago, M.; Soengas, M. S.; de Moraes Barros, S. B. und Maria-Engler, S. S.** *Artificial Skin in Perspective: Concepts and Applications*. Pigment cell & melanoma research 24, 35-50, doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00786.x (2011).

- 14 **Bruns, J.** *Biokompatibilitäts- und Hämkompatibilitätsuntersuchungen von Aminocellulosen*. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena (2015).
- 15 **Calderone, R. A. und Fonzi, W. A.** *Virulence factors of Candida albicans*. Trends in Microbiology 9, 327-335 (2001).
- 16 **Carlson, M. W.; Alt-Holland, A.; Egles, C. und Garlick, J. A.** *Three-Dimensional Tissue Models of Normal and Diseased Skin*. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.] CHAPTER, Unit-19.19, doi:10.1002/0471143030.cb1909s41 (2008).
- 17 **Chung, J. H.; Youn, S. H.; Koh, W. S.; Eun, H. C.; Cho, K. H.; Park, K. C. und Youn, J. I.** *Ultraviolet B Irradiation-Enhanced Interleukin (IL)-6 Production and mRNA Expression Are Mediated by IL-1α in Cultured Human Keratinocytes*. Journal of Investigative Dermatology 106, 715-720, doi:10.1111/1523-1747.ep12345608 (1996).
- 18 **Cutler, J. E.** *Putative virulence factors of Candida albicans*. Annual Review of Microbiology 45, 187-218, doi:10.1146/annurev.mi.45.100191.001155 (1991).
- 19 **da Silva Dantas, A.; Lee, K. K.; Raziunaite, I.; Schaefer, K.; Wagener, J.; Yadav, B. und Gow, N. A. R.** *Cell biology of Candida albicans–host interactions*. Current Opinion in Microbiology 34, 111-118, doi:10.1016/j.mib.2016.08.006 (2016).
- 20 **Dominiak, K.** *<sup>13</sup>C-NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Substituentenverteilung in Cellulosexanthogenaten* Dissertation, Technische Universität Berlin (2010).
- 21 **Dongari-Bagtzoglou, A. und Kashleva, H.** *Candida albicans triggers interleukin-8 secretion by oral epithelial cells*. Microbial pathogenesis 34, 169-177, doi:10.1016/S0882-4010(03)00004-4 (2003).
- 22 **Donlan, R. M. und Costerton, J. W.** *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clinical Microbiology Reviews 15, 167-193 (2002).
- 23 **Douglas, L. J.** *Candida biofilms and their role in infection*. Trends in Microbiology 11, 30-36 (2003).
- 24 **Eaglstain, W. H. und Falanga, V.** *Tissue engineering and the development of Apligraf®, a human skin equivalent*. Clinical Therapeutics 19, 894-905, doi:10.1016/S0149-2918(97)80043-4 (1997).
- 25 **El Ghalbzouri, A.; Lamme, E. und Ponc, M.** *Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis*. Cell and Tissue Research 310, 189-199, doi:10.1007/s00441-002-0621-0 (2002).
- 26 **Elliott, N. T. und Yuan, F.** *A Review of Three-Dimensional In Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies*. Journal of Pharmaceutical Sciences 100, 59-74, doi:10.1002/jps.22257 (2011).
- 27 **Ernst, J. F.** *Transcription factors in Candida albicans - environmental control of morphogenesis*. Microbiology 146 ( Pt 8), 1763-1774, doi:10.1099/00221287-146-8-1763 (2000).

- 28 **Evers, D.** *Der Einfluss des antimikrobiellen Peptides LL-37 auf Candida albicans und den Infektionsprozess in vitro.* Dissertation, Technische Universität Carolina-Wilhelmina Braunschweig (2012).
- 29 **Finger, S.; Fink, S.; Winter, D.; Wiegand, C.; Liebert, T.; Heinze, T. und Hipler, U. C.** *Effects of EDA-and TAEA-functionalized celluloses in three dimensional skin models with Candida albicans.* Mycoses 58, 40-68, doi:10.1111/myc.12362 (2015).
- 30 **Finger, S.; Wichert, S.; Wiegand, C.; Liebert, T.; Heinze, T. und Hipler, U. C.** *Antimicrobial activity of 6-deoxy-6-aminoethylenamino celluloses.* Mycoses 58, 40-68, doi:10.1111/myc.12362 (2015).
- 31 **Finger, S.; Wiegand, C.; Buschmann, H. J. und Hipler, U. C.** *Antibacterial properties of cyclodextrin-antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay.* International Journal of Pharmaceutics 452, 188-193, doi:10.1016/j.ijpharm.2013.04.080 (2013).
- 32 **Finger, S.; Wiegand, C.; Buschmann, H. J. und Hipler, U. C.** *Antimicrobial properties of cyclodextrin-antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay.* International Journal of Pharmaceutics 436, 851-856, doi:10.1016/j.ijpharm.2012.07.009 (2012).
- 33 **Finger, S.; Wiegand, C.; Liebert, T.; Heinze, T. und Hipler, U. C.** *Aminocellulosen sind in einem Co-Kulturmodell mit humanen HaCaT-Keratinozyten und Candida albicans antimikrobiell wirksam.* Mycoses 57, 31-44, doi:10.1111/myc.12217 (2014).
- 34 **Finger, S.; Wiegand, C.; Liebert, T.; Heinze, T. und Hipler, U. C.** *In vitro Untersuchung der antimykotischen Wirkung von funktionalisierten Biomakromolekülen gegenüber Candida albicans, Malassezia pachydermatis und Trichophyton rubrum.* Mycoses 56, 14-28, doi:10.1111/myc.12110 (2013).
- 35 **Finger, S.; Winter, D.; Wiegand, C.; Liebert, T.; Heinze, T. und Hipler, U. C.** *Biocompatibility of aminocelluloses in a co-culture model of human HaCaT keratinocytes and Candida albicans.* Experimental Dermatology 23, 1-60, doi:10.1111/exd.12314 (2014).
- 36 **Finger, S.; Winter, D.; Wiegand, C.; Liebert, T.; Heinze, T. und Hipler, U. C.** *Functional biomacromolecules and their properties on human HaCaT keratinocytes in co-culture with bacteria.* Experimental Dermatology 22, 2-47, doi:10.1111/exd.12072 (2013).
- 37 **Finger, S.; Zieger, M.; Wiegand, C.; Liebert, T.; Heinze, T.; Elsner, P. und Hipler, U.-C.** *Biocompatibility and Antibacterial Effects of 6-Deoxy-6-Aminoethyleneamino Cellulose.* Journal of Biosciences and Medicines 6, 51-62, doi:10.4236/jbm.2018.61006 (2018).
- 38 **Fink, S.** *Plasma-Behandlung eines 3D-Hautmodelles – Zytotoxizität und antimikrobielle Wirkung* Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena (2014).
- 39 **Fouda, M. M.; Knittel, D.; Hipler, U. C.; Elsner, P. und Schollmeyer, E.** *Antimycotic influence of beta-cyclodextrin complexes—In vitro measurements using laser nephelometry in microtiter plates.* International Journal of Pharmaceutics 311, 113-121, doi:10.1016/j.ijpharm.2005.12.028 (2006).



- 40 **Ganske, K.; Wiegand, C.; Hipler, U. C. und Heinze, T.** *Synthesis of Novel Cellulose Carbamates Possessing Terminal Amino Groups and Their Bioactivity*. *Macromolecular Bioscience* 16, 451-461, doi:10.1002/mabi.201500324 (2016).
- 41 **Gow, N. A. R.; van de Veerdonk, F. L.; Brown, A. J. P. und Netea, M. G.** *Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization*. *Nature reviews. Microbiology* 10, 112-122, doi:10.1038/nrmicro2711 (2011).
- 42 **Grossman, R. M.; Krueger, J.; Yourish, D.; Granelli-Piperno, A.; Murphy, D. P.; May, L. T.; Kupper, T. S.; Sehgal, P. B. und Gottlieb, A. B.** *Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 6367-6371 (1989).
- 43 **Gurr, E.** *Synthetic Dyes in Biology, Medicine And Chemistry*. Elsevier Science (2012).
- 44 **Halliwell, B. und Aruoma, O. I.** *DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems*. *FEBS Letters* 281, 9-19, doi:doi:10.1016/0014-5793(91)80347-6 (1991).
- 45 **He, W.; Guo, X.; Xiao, L. und Feng, M.** *Study on the mechanisms of chitosan and its derivatives used as transdermal penetration enhancers*. *International Journal of Pharmaceutics* 382, 234-243, doi:10.1016/j.ijpharm.2009.07.038 (2009).
- 46 **Heinze, T.** *Cellulose: Structure and Properties*. *Advances in Polymer Science*, Ch. 319, 1-52 Springer Berlin Heidelberg, (2015).
- 47 **Heinze, T.; Nikolajski, M.; Daus, S.; Besong, T. M. D.; Michaelis, N.; Berlin, P.; Morris, G. A.; Rowe, A. J. und Harding, S. E.** *Protein-like Oligomerization of Carbohydrates*. *Angewandte Chemie International Edition* 50, 8602-8604, doi:10.1002/anie.201103026 (2011).
- 48 **Heinze, T.; Pfeifer, A.; Koschella, A.; Schaller, J. und Meister, F.** *Solvent-free synthesis of 6-deoxy-6-( $\omega$ -aminoalkyl)amino cellulose*. *Journal of Applied Polymer Science* 133, doi:10.1002/app.43987 (2016).
- 49 **Heinze, T.; Siebert, M.; Berlin, P. und Koschella, A.** *Biofunctional Materials Based on Amino Cellulose Derivatives – A Nanobiotechnological Concept*. *Macromolecular Bioscience* 16, 10-42, doi:10.1002/mabi.201500184 (2015).
- 50 **Hipler, B.; Brand, S.; Angersbach, S. und Rückert, C.** *Monitoring des Wachstums von Mikroorganismen mit Hilfe der Nephelometrie*. *BIOspektrum* 9, 648-649 (2003).
- 51 **Hipler, U. C.; Wiegand, C. und Reddersen, K.** *Verbundvorhaben: Thüringer Applikationsplattform für homogene Polysaccharidchemie - TAP - im Rahmen des Forschungsprogrammes des BMBF "Innovative Regionale Wachstumskerne", Modul WK-Potentiale, Upscaling von Aminocellulose für biosensorische und kosmetische Anwendungen, Teilprojekt 2 Biologische Charakterisierung von Aminocellulosen*. BMBF Abschlussbericht (2013).
- 52 **Hoffmann, E.; Dittrich-Breiholz, O.; Holtmann, H. und Kracht, M.** *Multiple control of interleukin-8 gene expression*. *Journal of Leukocyte Biology* 72, 847-855, doi:10.1189/jlb.72.5.847 (2002).

- 53 **Hosseinnejad, M. und Jafari, S. M.** *Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan.* International Journal of Biological Macromolecules 85, 467-475, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022 (2016).
- 54 **Hostetter, M. K.** *Adhesins and ligands involved in the interaction of Candida spp. with epithelial and endothelial surfaces.* Clinical Microbiology Reviews 7, 29-42 (1994).
- 55 **Hube, B.** *From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of Candida albicans.* Current Opinion in Microbiology 7, 336-341, doi:10.1016/j.mib.2004.06.003 (2004).
- 56 **Imokawa, G.; Akasaki, S.; Minematsu, Y. und Kawai, M.** *Importance of intercellular lipids in water-retention properties of the stratum corneum: induction and recovery study of surfactant dry skin.* Archives of Dermatological Research 281, 45-51, doi:10.1007/BF00424272 (1989).
- 57 **Jedvert, K. und Heinze, T.** *Cellulose modification and shaping – a review.* Journal of Polymer Engineering 37, 845, doi:10.1515/polyeng-2016-0272 (2017).
- 58 **JIS L 1902:2008.** *Testing for Antibacterial Activity and Efficacy on Textile Products.* Japanese Industrial Standard (2008).
- 59 **Jung, A.; Berlin, P. und Wolters, B.** *Biomolecule-compatible support structures for biomolecule coupling to physical measuring principle surfaces.* IEE Proceedings - Nanobiotechnology 151, 87-94 (2004).
- 60 **Kabir, M. A.; Hussain, M. A. und Ahmad, Z.** *Candida albicans: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens.* International Scholarly Research Network Microbiology 2012, 538694, doi:10.5402/2012/538694 (2012).
- 61 **Kashem, S. W. und Kaplan, D. H.** *Skin Immunity to Candida albicans.* Trends in immunology 37, 440-450, doi:10.1016/j.it.2016.04.007 (2016).
- 62 **Khrenova, L.** *Pathophysiologie und Immunologie der Hautreagibilität gegenüber NaOH: Objektivierung von Hautempfindlichkeit mittels nichtinvasiver Untersuchungsverfahren; Standardisierung von NaOH-Irritabilitätstests; Identifizierung immunologischer Ursachen der Hautempfindlichkeit mittels Abrissmethode; inter- und intraindividuelle Unterschiede in der Hautreagibilität gegenüber NaOH.* Logos Verlag Berlin (2011).
- 63 **Kindinger, I.; Daneshian, M.; Baur, H.; Gabrio, T.; Hofmann, A.; Fennrich, S.; von Aulock, S. und Hartung, T.** *A new method to measure air-borne pyrogens based on human whole blood cytokine response.* Journal of Immunological Methods 298, 143-153, doi:10.1016/j.jim.2005.01.006 (2005).
- 64 **Kirkpatrick, C. J.; Bittinger, F.; Wagner, M.; Kohler, H.; van Kooten, T. G.; Klein, C. L. und Otto, M.** *Current trends in biocompatibility testing.* Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H 212, 75-84 (1998).
- 65 **Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H. P. und Bohn, A.** *Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material.* Angewandte Chemie International Edition 44, 3358-3393, doi:10.1002/anie.200460587 (2005).

- 66 **Kolls, J. K.; McCray, P. B., Jr. und Chan, Y. R.** *Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins*. Nature reviews. Immunology 8, 829-835, doi:10.1038/nri2433 (2008).
- 67 **Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K. und Park, H. J.** *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review*. International journal of food microbiology 144, 51-63, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012 (2010).
- 68 **Konstantinova, N. V.; Duong, D.-M. T.; Remenyik, E.; Hazarika, P.; Chuang, A. und Duvic, M.** *Interleukin-8 Is Induced in Skin Equivalents and Is Highest in Those Derived from Psoriatic Fibroblasts*. Journal of Investigative Dermatology 107, 615-621, doi:10.1111/1523-1747.ep12584215 (1996).
- 69 **Kos, C.** [https://www.hautarzt-klagenfurt.at/upload/imgproc/1857160\\_th.jpg](https://www.hautarzt-klagenfurt.at/upload/imgproc/1857160_th.jpg). (2018).
- 70 **Koschella, A.** *Neue Funktionspolymere durch regioselektiv gesteuerte Synthesen aus Cellulose und NMR-spektroskopische Charakterisierung der unkonventionellen Substituentenmuster*. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena (2000).
- 71 **Kühbacher, A.; Burger-Kentischer, A. und Rupp, S.** *Interaction of Candida Species with the Skin*. Microorganisms 5, 32, doi:10.3390/microorganisms5020032 (2017).
- 72 **Kühbacher, A.; Henkel, H.; Stevens, P.; Grumaz, C.; Finkelmeier, D.; Burger-Kentischer, A.; Sohn, K. und Rupp, S.** *Central Role for Dermal Fibroblasts in Skin Model Protection against Candida albicans*. The Journal of Infectious Diseases 215, 1742-1752, doi:10.1093/infdis/jix153 (2017).
- 73 **Kumamoto, C. A.** *Candida biofilms*. Current Opinion in Microbiology 5, 608-611 (2002).
- 74 **Kunz-Schughart, L. A.; Kreutz, M. und Knuechel, R.** *Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology*. International Journal of Experimental Pathology 79, 1-23, doi:10.1046/j.1365-2613.1998.00051.x (1998).
- 75 **Kürschner, U.** *Untersuchungen zur Toxizität und Biotransformation an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2007).
- 76 **Lan, C.-Y.; Newport, G.; Murillo, L. A.; Jones, T.; Scherer, S.; Davis, R. W. und Agabian, N.** *Metabolic specialization associated with phenotypic switching in Candida albicans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 14907-14912, doi:10.1073/pnas.232566499 (2002).
- 77 **Langner, A.** *Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Untersuchung der Biotransformation von Arzneistoffen*. Pharmazie in unserer Zeit 24, 207-218, doi:10.1002/pauz.19950240410 (1995).
- 78 **Maron, D. M. und Ames, B. N.** *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test*. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects 113, 173-215, doi:10.1016/0165-1161(83)90010-9 (1983).
- 79 **Marques, A. P.; Reis, R. L. und Hunt, J. A.** *The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies*. Biomaterials 23, 1471-1478 (2002).

- 80 **Mathes, S. H.; Ruffner, H. und Graf-Hausner, U.** *The use of skin models in drug development.* Advanced drug delivery reviews 69-70, 81-102, doi:10.1016/j.addr.2013.12.006 (2014).
- 81 **Mielke, K.** *Etablierung eines In-vitro-Hautmodells zur Untersuchung der Zytotoxizität von Antiseptika* Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena (2013).
- 82 **Müller, G. und Kramer, A.** *Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61, 1281-1287, doi:10.1093/jac/dkn125 (2008).
- 83 **Nikolajski, M.; Adams, G. G.; Gillis, R. B.; Besong, D. T.; Rowe, A. J.; Heinze, T. und Harding, S. E.** *Protein-like fully reversible tetramerisation and super-association of an aminocellulose.* Scientific Reports 4, 3861, doi:10.1038/srep03861 (2014).
- 84 **Nikolajski, M.; Wotschadlo, J.; Clement, J. H. und Heinze, T.** *Amino-functionalized cellulose nanoparticles: preparation, characterization, and interactions with living cells.* Macromolecular Bioscience 12, 920-925 (2012).
- 85 **Odds, F. C.** *Candida and Candidosis.* Elsevier Science Health Science Division (1988).
- 86 **Odds, F. C.** *Pathogenesis of Candida infections.* Journal of the American Academy of Dermatology 31, S2-5 (1994).
- 87 **Odds, F. C.; Webster, C. E.; Mayuranathan, P. und Simmons, P. D.** *Candida concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis.* Journal of Medical and Veterinary Mycology 26, 277-283 (1988).
- 88 **Pampaloni, F.; Reynaud, E. G. und Stelzer, E. H. K.** *The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue.* Nature Reviews Molecular Cell Biology 8, 839, doi:10.1038/nrm2236 (2007).
- 89 **Pfaffl, M. W.** *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.* Nucleic Acids Research 29, e45-e45 (2001).
- 90 **Pfaller, M. A.; Jones, R. N.; Doern, G. V.; Fluit, A. C.; Verhoef, J.; Sader, H. S.; Messer, S. A.; Houston, A.; Coffman, S. und Hollis, R. J.** *International surveillance of blood stream infections due to Candida species in the European SENTRY program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents.* Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 35, 19-25, doi:10.1016/S0732-8893(99)00046-2 (1999).
- 91 **Rahn, K.; Diamantoglou, M.; Klemm, D.; Berghmans, H. und Heinze, T.** *Homogeneous synthesis of cellulose p-toluenesulfonates in N,N-dimethylacetamide/LiCl solvent system.* Die Angewandte Makromolekulare Chemie 238, 143-163, doi:10.1002/apmc.1996.052380113 (1996).
- 92 **Richter, G.** *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken ; 19 Tabellen.* Thieme (2003).
- 93 **Říhová, B.** *Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers.* Advanced drug delivery reviews 21, 157-176 (1996).

- 94 **Rouabhia, M.; Ross, G.; Pagé, N. und Chakir, J.** *Interleukin-18 and gamma interferon production by oral epithelial cells in response to exposure to Candida albicans or lipopolysaccharide stimulation.* Infection and Immunity 70, 7073-7080, doi:10.1128/IAI.70.12.7073-7080.2002 (2002).
- 95 **Ruhnke, M.** *Epidemiology of Candida albicans infections and role of non-Candida-albicans yeasts.* Current Drug Targets 7, 495-504 (2006).
- 96 **Sarji, E. K.** *Untersuchung zum Einfluss von Aminocellulosen auf S. aureus, E. coli, K. pneumoniae mithilfe der Mikroplattenlasernephelometrie und Chemilumineszenz* Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena (2016).
- 97 **Saville, S. P.; Lazzell, A. L.; Monteagudo, C. und Lopez-Ribot, J. L.** *Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of Candida albicans during infection.* Eukaryotic Cell 2, 1053-1060 (2003).
- 98 **Schaller, M.; Boeld, U.; Oberbauer, S.; Hamm, G.; Hube, B. und Korting, H. C.** *Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis.* Microbiology 150, 2807-2813, doi:10.1099/mic.0.27169-0 (2004).
- 99 **Schaller, M.; Mailhammer, R.; Grassl, G.; A Sander, C.; Hube, B. und C Korting, H.** *Infection of Human Oral Epithelia with Candida Species Induces Cytokine Expression Correlated to the Degree of Virulence.* The Journal of investigative dermatology 118, 652-657, doi:10.1046/j.1523-1747.2002.01699.x (2002).
- 100 **Schaller, M.; Zakikhany, K.; Weindl, G.; Borelli, C.; Korting, H. C. und Hube, B.** *Characterization of the interaction between Candida albicans and host cells: In vitro model using reconstituted human skin and mucosa.* Hautarzt 59, 964-970, doi:10.1007/s00105-008-1549-4 (2008).
- 101 **Schelenz, S.** *Management of candidiasis in the intensive care unit.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61 Suppl 1, i31-34, doi:10.1093/jac/dkm430 (2008).
- 102 **Schmitz, S.** *Der Experimentator: Zellkultur.* Spektrum Akademischer Verlag (2011).
- 103 **Schoop, V. M.; Fusenig, N. E. und Mirancea, N.** *Epidermal Organization and Differentiation of HaCaT Keratinocytes in Organotypic Coculture with Human Dermal Fibroblasts.* Journal of Investigative Dermatology 112, 343-353, doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x (1999).
- 104 **Schürmann, A. I.** *Untersuchungen des Einflusses von Aminocellulosen auf Candida Spezies mithilfe der Mikrotiterplattenlasernephelometrie und der Chemilumineszenz.* Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena (2017).
- 105 **Seyfarth, F.; Schliemann, S.; Elsner, P. und Hipler, U. C.** *Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against Candida albicans, Candida krusei and Candida glabrata.* International Journal of Pharmaceutics 353, 139-148, doi:10.1016/j.ijpharm.2007.11.029 (2008).

- 106 **Slutsky, B.; Staebell, M.; Anderson, J.; Risen, L.; Pfaller, M. und Soll, D. R.** *"White-opaque transition": a second high-frequency switching system in Candida albicans*. Journal of Bacteriology 169, 189-197 (1987).
- 107 **Sonntag, F.** *Ein Chip mit Herz, Kompakte Plattform für anspruchsvolle Perfusionszellkulturen*. GIT Spezial BIOforum, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, (2015).
- 108 **Steele, C. und Fidel, P.** *Cytokine and Chemokine Production by Human Oral and Vaginal Epithelial Cells in Response to Candida albicans*. Vol. 70 (2002).
- 109 **Sugiyama, J.; Okano, T.; Yamamoto, H. und Horii, F.** *Transformation of Valonia cellulose crystals by an alkaline hydrothermal treatment*. Macromolecules 23, 3196-3198, doi:10.1021/ma00214a029 (1990).
- 110 **Swidergall, M. und Ernst, J. F.** *Interplay between Candida albicans and the Antimicrobial Peptide Armory*. Eukaryotic Cell 13, 950-957, doi:10.1128/EC.00093-14 (2014).
- 111 **Tardif, F.; Goulet, J.-P.; Zakrzewski, A.; Chauvin, P. und Rouabhia, M.** *Involvement of interleukin-18 in the inflammatory response against oropharyngeal candidiasis*. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research 10, 239-249 (2004).
- 112 **Thewes, S.; Moran, G. P.; Magee, B. B.; Schaller, M.; Sullivan, D. J. und Hube, B.** *Phenotypic screening, transcriptional profiling, and comparative genomic analysis of an invasive and non-invasive strain of Candida albicans*. BMC Microbiol 8, 187, doi:10.1186/1471-2180-8-187 (2008).
- 113 **Toke, O.; Cegelski, L. und Schaefer, J.** *Peptide antibiotics in action: Investigation of polypeptide chains in insoluble environments by rotational-echo double resonance*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1758, 1314-1329, doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.031 (2006).
- 114 **Viscoli, C.; Girmenia, C.; Marinus, A.; Collette, L.; Martino, P.; Vandercam, B.; Doyen, C.; Lebeau, B.; Spence, D.; Krcmery, V.; De Pauw, B. und Meunier, F.** *Candidemia in Cancer Patients: A Prospective, Multicenter Surveillance Study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)*. Clinical Infectious Diseases 28, 1071-1079, doi:10.1086/514731 (1999).
- 115 **Wanke, I.; Steffen, H.; Christ, C.; Krismer, B.; Götz, F.; Peschel, A.; Schaller, M. und Schitteck, B.** *Skin Commensals Amplify the Innate Immune Response to Pathogens by Activation of Distinct Signaling Pathways*. Journal of Investigative Dermatology 131, 382-390, doi:10.1038/jid.2010.328 (2011).
- 116 **Weimer, C. M.** *Irritation durch Waschen und Desinfizieren*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg (2006).
- 117 **Weindl, G.; Naglik, J. R.; Kaesler, S.; Biedermann, T.; Hube, B.; Korting, H. C. und Schaller, M.** *Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling*. The Journal of clinical investigation 117, 3664-3672, doi:10.1172/JCI28115 (2007).
- 118 **Weindl, G.; Wagener, J. und Schaller, M.** *Epithelial Cells and Innate Antifungal Defense*. Journal of Dental Research 89, 666-675, doi:10.1177/0022034510368784 (2010).

- 119 **Welss, T.; Basketter, D. A. und Schröder, K. R.** *In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models.* Toxicology in Vitro 18, 231-243, doi:10.1016/j.tiv.2003.09.009 (2004).
- 120 **Wichert, S.** *Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung von Aminocellulosen anhand ihres Aminierungsgrades.* Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena (2015).
- 121 **Wiegand, C.; Bauer, M.; Hipler, U. C. und Fischer, D.** *Poly(ethyleneimines) in dermal applications: biocompatibility and antimicrobial effects.* International Journal of Pharmaceutics 456, 165-174, doi:10.1016/j.ijpharm.2013.08.001 (2013).
- 122 **Wiegand, C.; Heinze, T. und Hipler, U. C.** *Comparative in vitro study on cytotoxicity, antimicrobial activity, and binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds of alginate and silver-containing alginate.* Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 17, 511-521, doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00503.x (2009).
- 123 **Wiegand, C.; Winter, D. und Hipler, U. C.** *Molecular-weight-dependent toxic effects of chitosans on the human keratinocyte cell line HaCaT.* Skin pharmacology and physiology 23, 164-170, doi:10.1159/000276996 (2010).
- 124 **Wüstenberg, T.** *Cellulose und Cellulosederivate: Grundlagen, Wirkungen und Applikationen.* Behr's Verlag DE (2013).
- 125 **Zarth, C. S. P.; Koschella, A.; Pfeifer, A.; Dorn, S. und Heinze, T.** *Synthesis and characterization of novel amino cellulose esters.* Cellulose 18, 1315, doi:10.1007/s10570-011-9557-4 (2011).
- 126 **Zhang, Z. und Michniak-Kohn, B. B.** *Tissue Engineered Human Skin Equivalents.* Pharmaceutics 4, 26-41, doi:10.3390/pharmaceutics4010026 (2012).
- 127 **Zieger, M.; Wurlitzer, M.; Wiegand, C.; Reddersen, K.; Finger, S.; Elsner, P.; Laudeley, P.; Liebert, T.; Heinze, T. und Hipler, U. C.** *6-Deoxy-6-aminoethyleneamino cellulose: synthesis and study of hemocompatibility.* Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 26, 931-946, doi:10.1080/09205063.2015.1068546 (2015).

## FORMELVERZEICHNIS

- Formel 1-1 Der Biokompatibilitätsindex  $BI$  berechnet sich aus dem Verhältnis von der halbmaximalen letalen Konzentration  $LC_{50}$  zur halbmaximalen inhibitorischen Konzentration  $IC_{50}$ . ..... 11
- Formel 1-2 Anhand der Formel für die Dosis-Wirkungskurven kann der  $LC_{50}$ - bzw. der  $IC_{50}$ -Wert berechnet werden.  $A1$  – obere Grenze,  $A2$  – untere Grenze,  $p$  – Steigung der Kurve,  $x$  – AC-Konzentration,  $x_0$  –  $LC_{50}$  bzw.  $IC_{50}$ ,  $y$  – Viabilität bzw. antimikrobielle Wirksamkeit. .... 11



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1 Chemischer Aufbau von Cellulose. ....	1
Abbildung 1-2 Synthese von 6-Deoxy-6-aminoalkyl Cellulose mit Ethylendiamin (EDA, rot) bzw. Triamotriethylamin (TAEA, grün) als funktioneller Aminogruppe. ....	2
Abbildung 1-3 Die Pathogenität von <i>C. albicans</i> wird durch das komplexe Zusammenwirken von Virulenzfaktoren bestimmt (in Anlehnung an da Silva Dantas et al. <sup>19</sup> ). ....	5
Abbildung 1-4 Morphologische Formen von <i>C. albicans</i> . <i>C. albicans</i> kann als Blastospore (Hefeform; a), Pseudohyphe (b) oder Hyphye (c) wachsen. Die Balkenlänge entspricht 10 µm. ....	5
Abbildung 1-5 Aufbau der menschlichen Haut (verändert nach <sup>69</sup> ). ....	9
Abbildung 1-6 Veranschaulichung des Biokompatibilitätsindex (BI). ....	11
Abbildung 2-1 Schematischer Überblick zum Ansetzen einer 2d-Co-Kultur. ....	24
Abbildung 2-2 Schematischer Aufbau eines 3d-Hautmodells. ....	24
Abbildung 2-3 Schematischer Überblick zur Herstellung eines 3d-Hautmodells. ....	25
Abbildung 3-1 Ergebnisse der Mutagenitätsuntersuchung. Die AC wurden unter Verwendung des Bakterienstamms <i>S. typhimurium</i> TA98 auf eine potentielle mutagene Wirkung untersucht. Hierbei wurde ohne (links) bzw. mit S9-Mix (rechts) getestet. Alle AC (AC-EDA <sub>0,45</sub> : a und b; AC-EDA <sub>0,55</sub> : c und d; AC-TAEA <sub>0,35</sub> : e und f; AC-TAEA <sub>0,56</sub> : g und h) zeigen in diesem Test keine mutagene Wirkung. ....	39
Abbildung 3-2 Ergebnisse der Mutagenitätsuntersuchung. Die AC wurden unter Verwendung des Bakterienstamms <i>S. typhimurium</i> TA100 auf eine potentielle mutagene Wirkung untersucht. Hierbei wurde ohne (links) bzw. mit S9-Mix (rechts) getestet. Alle AC (AC-EDA <sub>0,45</sub> : a und b; AC-EDA <sub>0,55</sub> : c und d; AC-TAEA <sub>0,35</sub> : e und f; AC-TAEA <sub>0,56</sub> : g und h) zeigen in diesem Test keine mutagene Wirkung. ....	40
Abbildung 3-3 Antioxidative Wirkung von AC auf ROS (a) und RNS (b). Nur AC mit TAEA-Funktionalisierung sind in der Lage ROS zu inhibieren. AC weisen keine antioxidative Wirkung gegenüber RNS auf. ....	41
Abbildung 3-4 Nachweis der antimikrobiellen Wirkung unterschiedlicher AC-Konzentrationen (20 µg/ml bis 1250 µg/ml; AC-EDA <sub>0,45</sub> : a, AC-EDA <sub>0,55</sub> : b, AC-TAEA <sub>0,35</sub> : c und AC-TAEA <sub>0,56</sub> : d) auf <i>C. albicans</i> anhand der Wachstumsuntersuchung im MTP-Nephelometer über einen Inkubationszeitraum von 24 h. Zum Vergleich der antimikrobiellen Wirkung der AC wurden bei den Versuchen eine Negativ-Kontrolle (NK oder Wachstumskontrolle) und eine Positiv-Kontrolle (PK mit CHX) mitgeführt. Bei allen AC zeigt eine sich konzentrationsabhängige Wirkung gegenüber <i>C. albicans</i> . ....	43
Abbildung 3-5 Nachweis der antimikrobiellen Wirkung von AC (AC-EDA <sub>0,45</sub> : a, AC-EDA <sub>0,55</sub> : b, AC-TAEA <sub>0,35</sub> : c und AC-TAEA <sub>0,56</sub> : d) auf <i>C. albicans</i> anhand der Bestimmung des mikrobiellen ATP-Gehalts im Anschluss an die nephelometrische Untersuchung. Bei allen AC zeigt sich eine konzentrationsabhängige Wirkung gegenüber <i>C. albicans</i> . ....	44

Abbildung 3-6 Auftragung der Dosis-Wirkungs-Beziehung der AC im Zusammenhang der antimikrobiellen Aktivität gegenüber <i>C. albicans</i> . Unterhalb des Diagramms sind die jeweiligen IC <sub>50</sub> -Werte aufgelistet.....	45
Abbildung 3-7 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der fluoreszierenden AC (a). Durchlicht-(b) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (c) von <i>C. albicans</i> , inkubiert mit einer fluoreszierenden AC. Die Pfeile markieren auffällige gelbfluoreszierende Partikel, bei denen es sich um AC handelt. Einige Hefezellen fluoreszieren blau. Die Balkenlänge entspricht 10 µm.....	46
Abbildung 3-8 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>C. albicans</i> . <i>C. albicans</i> wurde über 24 h mit verschiedenen AC-Konzentrationen inkubiert. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (a) zeigen sich mit steigender AC-Konzentration (a: 156 µg/ml und b: 313 µg/ml) bläschenartige Strukturen an den Blastosporen. Bei einer AC-Konzentration von 625 µg/ml (d) sind die Blastosporen von einem dichten Film umhüllt. Die Balkenlänge entspricht 2 µm. ....	46
Abbildung 3-9 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>C. albicans</i> . <i>C. albicans</i> wurde über verschiedene Zeiträume mit einer AC-Konzentration von 313 µg/ml inkubiert. Nach 24 h (a) zeigen sich an den Blastosporen bläschenartige Strukturen. Diese sind nach 48 h (b), 72 h (c) und 96 h (d) hauptsächlich mit Pseudohyphen assoziiert. Die Balkenlänge entspricht 2 µm. ....	47
Abbildung 3-10 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>C. albicans</i> nach 24-stündiger Inkubation ohne (a) und mit AC (313 µg/ml, b und c). Die Balkenlänge entspricht 500 nm.....	47
Abbildung 3-11 Die Viabilität der HaCaT-Keratinocyten nach 24- bzw. 48-stündiger Behandlung mit AC-EDA <sub>0,45</sub> wurde anhand des zytosolischen ATP-Gehalts bestimmt (a). Das zytotoxische Potential wurde anhand des Nachweises von LDH ermittelt (b). Die freigesetzten Mengen an IL-8 (c) und IL-6 (d) in das Zellkulturmedium wurden mittels ELISA quantifiziert.....	49
Abbildung 3-12 Die Viabilität der HaCaT-Keratinocyten nach 24- bzw. 48-stündiger Behandlung mit AC-EDA <sub>0,55</sub> wurde anhand des zytosolischen ATP-Gehalts bestimmt (a). Das zytotoxische Potential wurde anhand des Nachweises des Enzyms LDH ermittelt (b). Die freigesetzten Mengen an IL-8 (c) und IL-6 (d) in das Zellkulturmedium wurden mittels ELISA quantifiziert.	50
Abbildung 3-13 Die Viabilität der HaCaT-Keratinocyten nach 24- bzw. 48-stündiger Behandlung mit AC-TAEA <sub>0,35</sub> wurde anhand des zytosolischen ATP-Gehalts bestimmt (a). Das zytotoxische Potential wurde anhand des Nachweises des Enzyms LDH ermittelt (b). Die freigesetzten Mengen an IL-8 (c) und IL-6 (d) in das Zellkulturmedium wurden mittels ELISA quantifiziert.	51
Abbildung 3-14 Die Viabilität der HaCaT-Keratinocyten nach 24- bzw. 48-stündiger Behandlung mit AC-TAEA <sub>0,56</sub> wurde anhand des zytosolischen ATP-Gehalts bestimmt (a). Das zytotoxische Potential wurde anhand des Nachweises des Enzyms LDH ermittelt (b). Die freigesetzten Mengen an IL-8 (c) und IL-6 (d) in das Zellkulturmedium wurden mittels ELISA quantifiziert.	52
Abbildung 3-15 Grafische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung und Zusammenfassung der LC <sub>50</sub> im 2d-Zellkulturmodell nach 24- (links) und 48-stündiger Inkubation (rechts) mit verschiedenen AC.....	53

- Abbildung 3-16 HaCaT-Keratinocyten wurden nach 24-stündiger Inkubation in Kulturmedium (Negativ-Kontrolle, a) bzw. mit Triton-X 100 (Positiv-Kontrolle, b) mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 13 und EthD-2 angefärbt und am Mikroskop ausgewertet. Die Balkenlänge entspricht 100  $\mu\text{m}$ . ..... 54
- Abbildung 3-17 HaCaT-Keratinocyten wurden nach 24-stündiger Inkubation mit AC-EDA<sub>0,45</sub> mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 13 und EthD-2 angefärbt und die Ergebnisse wurden am Mikroskop dokumentiert. Die HaCaT-Keratinocyten wurden mit 156  $\mu\text{g/ml}$  AC-EDA<sub>0,45</sub> (a) bzw. mit 313  $\mu\text{g/ml}$  (b), 625  $\mu\text{g/ml}$  (c), 1250  $\mu\text{g/ml}$  (d), 2500  $\mu\text{g/ml}$  (e) oder 5000  $\mu\text{g/ml}$  (f) inkubiert. Die Balkenlänge entspricht 100  $\mu\text{m}$ . ..... 54
- Abbildung 3-18 HaCaT-Keratinocyten wurden nach 24-stündiger Inkubation mit AC-EDA<sub>0,55</sub> mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 13 und EthD-2 angefärbt und die Ergebnisse wurden am Mikroskop dokumentiert. Die HaCaT-Keratinocyten wurden mit 156  $\mu\text{g/ml}$  AC-EDA<sub>0,55</sub> (a) bzw. mit 313  $\mu\text{g/ml}$  (b), 625  $\mu\text{g/ml}$  (c), 1250  $\mu\text{g/ml}$  (d), 2500  $\mu\text{g/ml}$  (e) oder 5000  $\mu\text{g/ml}$  (f) inkubiert. Die Balkenlänge entspricht 100  $\mu\text{m}$ . ..... 55
- Abbildung 3-19 HaCaT-Keratinocyten wurden nach 24-stündiger Inkubation mit AC-TAEA<sub>0,35</sub> mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 13 und EthD-2 angefärbt und die Ergebnisse wurden am Mikroskop dokumentiert. Die HaCaT-Keratinocyten wurden mit 5  $\mu\text{g/ml}$  AC-TAEA<sub>0,35</sub> (a) bzw. mit 10  $\mu\text{g/ml}$  (b), 20  $\mu\text{g/ml}$  (c), 39  $\mu\text{g/ml}$  (d), 78  $\mu\text{g/ml}$  (e) oder 156  $\mu\text{g/ml}$  (f) inkubiert. Die Balkenlänge entspricht 100  $\mu\text{m}$ . ..... 56
- Abbildung 3-20 HaCaT-Keratinocyten wurden nach 24-stündiger Inkubation mit AC-TAEA<sub>0,56</sub> mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 13 und EthD-2 angefärbt und die Ergebnisse wurden am Mikroskop dokumentiert. Die HaCaT-Keratinocyten wurden mit 5  $\mu\text{g/ml}$  AC-TAEA<sub>0,56</sub> (a) bzw. mit 10  $\mu\text{g/ml}$  (b), 20  $\mu\text{g/ml}$  (c), 39  $\mu\text{g/ml}$  (d), 78  $\mu\text{g/ml}$  (e) oder 156  $\mu\text{g/ml}$  (f) inkubiert. Die Balkenlänge entspricht 100  $\mu\text{m}$ . ..... 57
- Abbildung 3-21 Zellverträglichkeit (a und b) und Zytotoxizität (c und d) von AC-EDA<sub>0,45</sub> auf HaCaT-Keratinocyten im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts). ..... 58
- Abbildung 3-22 Freisetzung der Interleukine IL-6 (a und b), IL-8 (c und d) und IL-1 $\alpha$  (e und f) infolge der Inkubation von AC-EDA<sub>0,45</sub> im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts). ..... 60
- Abbildung 3-23 Zellverträglichkeit (a und b) und Zytotoxizität (c und d) von AC-EDA<sub>0,55</sub> auf HaCaT-Keratinocyten im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts). ..... 61
- Abbildung 3-24 Freisetzung der Interleukine IL-6 (a und b), IL-8 (c und d) und IL-1 $\alpha$  (e und f) infolge der Inkubation von AC-EDA<sub>0,55</sub> im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts). ..... 62
- Abbildung 3-25 Zellverträglichkeit (a und b) und Zytotoxizität (c und d) von AC-TAEA<sub>0,35</sub> auf HaCaT-Keratinocyten im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) oder *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts). ..... 63

Abbildung 3-26 Freisetzung der Interleukine IL-6 (a und b), IL-8 (c und d) und IL-1 $\alpha$ ( e und f) infolge der Inkubation von AC- TAEA <sub>0,35</sub> im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit <i>C. albicans</i> DSM 1386 (CD) oder <i>C. albicans</i> ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts).....	64
Abbildung 3-27 Zellverträglichkeit (a und b) und Zytotoxizität (c und d) von AC-TAEA <sub>0,56</sub> auf HaCaT-Keratinocyten im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit <i>C. albicans</i> DSM 1386 (CD) oder <i>C. albicans</i> ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts). ....	65
Abbildung 3-28 Freisetzung der Interleukine IL-6 (a und b), IL-8 (c und d) und IL-1 $\alpha$ ( e und f) infolge der Inkubation von AC-TAEA <sub>0,56</sub> im 2d-Co-Kulturmodell ohne bzw. mit <i>C. albicans</i> DSM 1386 (CD) oder <i>C. albicans</i> ATCC MYA-2876 (CA) nach 24 h (links) und 48 h (rechts).....	66
Abbildung 3-29 Die Quantifizierung der beiden <i>C. albicans</i> -Stämme DSM 1386 (CD) und ATCC MYA-2876 (CA) in den Co-Kulturmodellen erfolgte mittels qPCR. Die Reduktion der mikrobiellen Zellen nach 24- (a) und 48-stündiger (b) Inkubation im Co-Kulturmodell mit HaCaT-Keratinocyten und AC-EDA <sub>0,45</sub> wird in log-Stufen angegeben.....	67
Abbildung 3-30 Die Quantifizierung der beiden <i>C. albicans</i> -Stämme DSM 1386 (CD) und ATCC MYA-2876 (CA) in den Co-Kulturmodellen erfolgte mittels qPCR. Die Reduktion der mikrobiellen Zellen nach 24- (a) und 48-stündiger (b) Inkubation im Co-Kulturmodell mit HaCaT-Keratinocyten und AC-EDA <sub>0,55</sub> wird in log-Stufen angegeben.....	68
Abbildung 3-31 Die Quantifizierung der beiden <i>C. albicans</i> -Stämme DSM 1386 (CD) und ATCC MYA-2876 (CA) in den Co-Kulturmodellen erfolgte mittels qPCR. Die Reduktion der mikrobiellen Zellen nach 24- (a) und 48-stündiger (b) Inkubation im Co-Kulturmodell mit HaCaT-Keratinocyten und AC-TAEA <sub>0,35</sub> wird in log-Stufen angegeben. ....	69
Abbildung 3-32 Die Quantifizierung der beiden <i>C. albicans</i> -Stämme DSM 1386 (CD) und ATCC MYA-2876 (CA) in den Co-Kulturmodellen erfolgte mittels qPCR. Die Reduktion der mikrobiellen Zellen nach 24- (a) und 48-stündiger (b) Inkubation im Co-Kulturmodell mit HaCaT-Keratinocyten und AC-TAEA <sub>0,56</sub> wird in log-Stufen angegeben. ....	69
Abbildung 3-33 Analyse des zytotoxischen Potentials (a) und der Freisetzung der Interleukine IL-6 (b), IL-8 (c) und IL-1 $\alpha$ (d) bei 3d-Hautmodellen nach Inkubation mit PBS (Negativ-Kontrolle, NK), 0,5 % SDS (Positiv-Kontrolle, PK) oder mit je 1x10 <sup>3</sup> KBE/ml <i>C. albicans</i> DSM 1386 (CD) oder <i>C. albicans</i> ATCC MYA-2876 (CA). ....	71
Abbildung 3-34 Analyse des zytotoxischen Potentials (a) und der Freisetzung der Interleukine IL-6 (b), IL-8 (c) und IL-1 $\alpha$ (d) infolge der Inkubation 3d-Hautmodelle mit unterschiedlichen AC mit einer Konzentration von je 10 mg/ml.....	72
Abbildung 3-35 Analyse des zytotoxischen Potentials (a) und der Freisetzung der Interleukine IL-6 (b), IL-8 (c) und IL-1 $\alpha$ (d) infolge der Inkubation 3d-Hautmodelle mit <i>C. albicans</i> ATCC MYA-2876 (CA) und unterschiedlichen AC mit einer Konzentration von je 10 mg/ml.....	73
Abbildung 3-36 Analyse des zytotoxischen Potentials (a) und der Freisetzung der Interleukine IL-6 (b), IL-8 (c) und IL-1 $\alpha$ (d) infolge der Inkubation 3d-Hautmodelle mit <i>C. albicans</i> DSM 1386 (CD) und unterschiedlichen AC mit einer Konzentration von je 10 mg/ml.....	74

- Abbildung 3-37 Die Analyse der relativen Expression der AMP hBD-3 und LL-37, als auch der Entzündungsmediatoren IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-18 der 3d-Hautmodelle, welche 24 h (a) bzw. 48 h (b) mit 0,5 % SDS (als Positiv-Kontrolle, PK) und mit den *C. albicans*-Stämmen DSM 1386 (CD) und ATCC MYA-2876 (CA) inkubiert wurden, erfolgte mittels RT-qPCR. .... 75
- Abbildung 3-38 Die Analyse der relativen Expression der AMP hBD-3 und LL-37, als auch der Entzündungsmediatoren IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-18 der 3d-Hautmodelle, welche 24 h (a) bzw. 48 h (b) mit den verschiedenen AC inkubiert wurden, erfolgte mittels RT-qPCR. .... 76
- Abbildung 3-39 Die Analyse der relativen Expression der AMP hBD-3 und LL-37, als auch der Entzündungsmediatoren IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-18 der 3d-Hautmodelle, welche 24 h (a) bzw. 48 h (b) mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) und den verschiedenen AC inkubiert wurden, erfolgte mittels RT-qPCR. .... 77
- Abbildung 3-40 Die Analyse der relativen Expression der AMP hBD-3 und LL-37, als auch der Entzündungsmediatoren IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-18 der 3d-Hautmodelle, welche 24 h (a) bzw. 48 h (b) mit *C. albicans* DSM 1386 (CD) und den verschiedenen AC inkubiert wurden, erfolgte mittels RT-qPCR. .... 77
- Abbildung 3-41 3d-Hautmodelle wurden für 24 h (obere Reihe; a bis d) bzw. für 48 h (untere Reihe; e bis h) mit PBS (als Negativ-Kontrolle; a und e), SDS (als Positiv-Kontrolle; b und f), *C. albicans* DSM 1386 (CD; c und g) bzw. mit *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA; d und h) inkubiert und nach histologischer Präparation am Durchlichtmikroskop fotografiert. Die Hautmodell-Präparate wurden mit HE (PBS und SDS) bzw. mit PAS (*C. albicans*) angefärbt. Die Balkenlänge entspricht 50  $\mu$ m. .... 78
- Abbildung 3-42 3d-Hautmodelle wurden für 24 h (obere Reihe; a bis d) bzw. für 48 h (untere Reihe; e bis h) mit vier AC, welche unterschiedliche Funktionalisierungen und DS-Werte aufweisen, inkubiert (AC-EDA<sub>0,45</sub>: a und e; AC-EDA<sub>0,55</sub>: b und f; AC-TAEA<sub>0,35</sub>: c und g; AC-TAEA<sub>0,56</sub>: d und h). Nach histologischer Präparation und Färbung mit HE, wurden die Hautmodellschnitte am Durchlichtmikroskop fotografiert. Die Balkenlänge entspricht 50  $\mu$ m. .... 79
- Abbildung 3-43 3d-Hautmodelle wurden zunächst mit dem Hefepilz *C. albicans* ATCC MYA-2876 (CA) infiziert und anschließend für 24 h (obere Reihe; a bis d) bzw. 48 h (untere Reihe; e bis h) mit unterschiedlichen AC inkubiert (AC-EDA<sub>0,45</sub>: a und e; AC-EDA<sub>0,55</sub>: b und f; AC-TAEA<sub>0,35</sub>: c und g; AC-TAEA<sub>0,56</sub>: d und h). Nach histologischer Präparation und PAS-Färbung, wurden die Hautmodellschnitte am Durchlichtmikroskop fotografiert. Die Balkenlänge entspricht 50  $\mu$ m... 80
- Abbildung 3-44 3d-Hautmodelle wurden zunächst mit dem Hefepilz *C. albicans* DSM 1386 (CD) infiziert und anschließend für 24 h (obere Reihe; a bis d) bzw. 48 h (untere Reihe; e bis h) mit unterschiedlichen AC inkubiert (AC-EDA<sub>0,45</sub>: a und e; AC-EDA<sub>0,55</sub>: b und f; AC-TAEA<sub>0,35</sub>: c und g; AC-TAEA<sub>0,56</sub>: d und h). Nach histologischer Präparation und PAS-Färbung, wurden die Hautmodellschnitte am Durchlichtmikroskop fotografiert. Die Balkenlänge entspricht 50  $\mu$ m. .... 81

# TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1 Zellen, Zellkulturmedien und Zusätze .....	13
Tabelle 2-2 Chemikalien .....	14
Tabelle 2-3 Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen. Puffer und Lösungen, welche Bestandteile eines kommerziell-erhältlichen Kits oder Assays sind, sind nicht aufgelistet.....	15
Tabelle 2-4 Geräte .....	16
Tabelle 2-5 Verbrauchsmaterialien .....	17
Tabelle 2-6 Kits und Assays.....	18
Tabelle 2-7 Primersequenzen und Referenzgen; hergestellt von Eurofins.....	19
Tabelle 2-8 Eigenschaften der verwendeten AC. ....	20
Tabelle 2-9 Übersicht über die Durchführung der ELISA zur quantitativen Bestimmung der Interleukine IL-6, IL-1 $\alpha$ und IL-8. ....	28
Tabelle 2-10 Zusammensetzung des Master-Mix (pro gDNA-Probe; links) zur Quantifizierung von <i>C. albicans</i> im Co-Kulturmodell und Übersicht über die qPCR Programmabläufe im Rotor-Gene-Q zur Quantifizierung von <i>C. albicans</i> (rechts). ....	31
Tabelle 2-11 Zusammensetzung des Master-Mix (pro RNA-Probe) für die Reverse-Transkriptase-Reaktion (links) und Thermocycler-Protokoll (rechts). ....	32
Tabelle 2-12 Zusammensetzung des Master-Mix (links) und Übersicht über den RT-qPCR Programmablauf im Rotor-Gene-Q für die relative Expression von Entzündungsmediatoren und antimikrobiellen Peptiden (rechts). ....	32
Tabelle 2-13 Übersicht über den Ablauf der automatisierten Färbung der 3d-Co-Kulturmodelle mit Periodsäure und Schiff'scher Reagenz (links) bzw. mit Hämatoxylin-Eosin (rechts). ....	33
Tabelle 3-1 Reaktionszeit der Endotoxinstandards im LAL-Test. Je höher der Endotoxingehalt ist, desto schneller findet die enzymatische Reaktion statt. ....	36
Tabelle 3-2 Zur Kontrolle des LAL-Testverfahrens wurden AC-Verdünnungen mit je 0,5 EU/ml als positive Produktkontrolle (PPC) versetzt. Befindet sich die Wiederfindungsrate der PPC im Bereich von 50 % (0,25 EU/ml) bis 200 % (1 EU/ml), so handelt es sich um ein gültiges Testergebnis (fett markiert). ....	37
Tabelle 3-3 Reaktionszeit der jeweiligen AC-Lösungen (1:10000 verdünnt) mit und ohne positive Produktprobe (PPC; 0,5 EU/ml).....	37
Tabelle 3-4 Zusammenfassung der ermittelten LC <sub>50</sub> - und IC <sub>50</sub> -Werte für die jeweiligen AC zu einem Biokompatibilitätsindex (BI).....	70
Tabelle 3-5 Effizienz der RNA-Primer. ....	75

## EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Person bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Cornelia Wiegand.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

## DANKSAGUNG

Die Erstellung einer wissenschaftlichen Arbeit ist kein Werk einer einzelnen Person, daher möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit begleitet haben.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Uta-Christina Hipler für die Bereitstellung der interessanten Aufgabenstellung und für die Unterstützung auf allen Wegen von Beginn bis zum Ende meiner Promotionszeit.

Bei Dr. Cornelia Wiegand möchte ich mich besonders für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, die fachliche Unterstützung und die stete Hilfsbereitschaft ganz herzlich bedanken.

Prof. Dr. Thomas Heinze danke ich außerordentlich für die Bereitstellung der Aminocellulosen und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dem Team vom Elektronenmikroskopischen Zentrum in Jena danke ich für die technische Unterstützung bei den aussagekräftigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

All meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor in Jena danke ich ganz herzlich für die unermüdliche Hilfsbereitschaft, die außerordentliche Zusammenarbeit und die herzliche und fröhliche Arbeitsatmosphäre. Besonders dankbar bin ich auch für die schönen gemeinsamen Zeiten außerhalb des Laboralltags. Während meiner Promotionszeit sind viele Freundschaften entstanden, die ich nicht missen möchte.

Meiner Familie danke ich außerordentlich für die Unterstützung in jederlei Hinsicht, für die Aufmunterungen und für das Schaffen von Freiräumen zum Schreiben meiner Dissertation.



# PUBLIKATIONSLISTE

## Publikationen

- *Biocompatibility and antibacterial effects of 6-deoxy-6-aminoethyleneamino cellulose*  
**Finger S.**, Zieger M., Wiegand C., Liebert T., Heinze T., Elsner P., Hipler U.-C. (2018)  
J Biosci Med 6 (1): 51-62
- *Cytocompatibility testing of cyclodextrin-functionalized antimicrobial textiles - a comprehensive approach*  
Reddersen K., **Finger S.**, Zieger M., Wiegand C., Buschmann H.-J., Elsner P., Hipler U.-C.  
(2016) J Mater Sci: Mater Med 27:190
- *6-Deoxy-6-aminoethyleneamino cellulose: synthesis and study of hemocompatibility*  
Zieger M., Wurlitzer M., Wiegand C., Reddersen K., **Finger S.**, Elsner P., Laudeley P., Liebert T., Heinze T., Hipler U.-C. (2015) J Biomater Sci Polym 26 (14): 931-46
- *Antibacterial properties of cyclodextrin–antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay*  
**Finger S.**, Wiegand C., Buschmann H.-J., Hipler U.-C. (2013) Int J Pharmaceut 452: 188-193
- *Antimicrobial properties of cyclodextrin–antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay*  
**Finger S.**, Wiegand C., Buschmann H.-J., Hipler U.-C. (2012) Int J Pharmaceut 436: 851-856

## Vorträge

- *Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit funktionalisierter Oberflächen*  
**Finger S.**  
11. ThGOT/ 10. Biomaterial-Kolloquium, Zeulenroda, 16. bis 19. September 2015
- *Beurteilung der antimikrobiellen Ausrüstung von Oberflächen*  
**Finger S.**, Zieger M., Wiegand C., Rode C., Wyrwa R., Grünler B., Hipler U.-C.  
48. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. (DMykG), Salzburg, 04. bis 06. September 2014
- *Analysemethoden von mikrobiellem Befall auf Kulturgütern – auch Mikroorganismen mögen Kunst*  
**Finger S.**  
3. Mikro-Workshop Inn-O-Kultur, Mikrobieller Befall auf Kulturgütern, Jena, 13. Mai 2014
- *Quantifizierung von Candida albicans mittels quantitativer PCR im Infektionsmodell mit humanen HaCaT-Keratinocyten unter Einfluss von Polykationen*  
**Finger S.**, Huschke S., Wiegand C., Hipler U.-C.  
47. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. (DMykG), Tübingen, 05. bis 07. September 2013

- *Charakterisierung der antimykotischen Wirkung von funktionalisierten Biomakromolekülen auf Candida albicans*

**Finger S.**, Wiegand C., Nietzsche S., Liebert T., Heinze T., Hipler U.-C.

47. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. (DMyKG), Tübingen, 05. bis 07. September 2013

### Posterpräsentationen

- *Vergleich der Biokompatibilität von Aminocellulosen in einem 2d-Keratinozyten-Modell und in einem 3d-Hautmodell*

**Finger S.**, Wiegand C., Hipler U.-C.

11. ThGOT/ 10. Biomaterial-Kolloquium, Zeulenroda, 16. bis 19. September 2015

- *Vergleich der Biokompatibilität von Aminocellulosen in einem 2d-Keratinozyten-Modell und in einem 3d-Hautmodell*

**Finger S.**, Wiegand C., Hipler U.-C.

49. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. (DMyKG) und 1st International Symposium of the CRC/Transregio FungiNet, Jena, 16. bis 19. September 2015

- *Antimikrobielle Wirksamkeit von Aminocellulosen in einem Co-Kulturmodell mit humanen HaCaT Keratinozyten und Candida albicans*

**Finger S.**, Wiegand C., Liebert T., Heinze T., Hipler U.-C.

DDG-Tagung, Berlin, 29. April bis 02. Mai 2015

- *Charakterisierung der antimikrobiellen Ausrüstung von Keramikoberflächen*

**Finger S.**, Wiegand C., Liebert T., Heinze T., Hipler U.-C.

DDG-Tagung, Berlin, 29. April bis 02. Mai 2015

- *Biocompatibility of aminocelluloses in monolayer keratinocyte cultures and three-dimensional skin models*

**Finger S.**, Wiegand C., Fink S., Liebert T., Heinze T., Hipler U.-C.

42th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Ulm, 05. bis 07. März 2015

- *Aminocellulose-coating of glass slides improves keratinocyte attachment and proliferation in vitro*

**Finger S.**, Wiegand C., Fink S., Liebert T., Heinze T., Hipler U.-C.

42th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Ulm, 05. bis 07. März 2015

- *Antifungal effects of functionalized biomacromolecules against Candida albicans, Malassezia pachydermatis and Trichophyton rubrum in vitro*

Wiegand C., **Finger S.**, Liebert T., Heinze T., Hipler U.-C.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM), Dresden, 06. bis 08. November 2014

- *Aminocellulosen sind in einem Co-Kulturmodell mit humanen HaCaT-Keratinocyten und Candida albicans antimikrobiell wirksam*

**Finger S.**, Wiegand C., Hipler U.-C.

48. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. (DMykG), Salzburg, 04. bis 06. September 2014

- **Auszeichnung mit einem Posterpreis** -

- *Functional biomacromolecules and their properties on human HaCaT keratinocytes in co-culture with bacteria*

**Finger S.**, Wiegand C., Winter D., Liebert T., Heinze T., Hipler U.-C.

41th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Köln, 14. bis 16. März 2014

- *Functional biomacromolecules and their properties on human HaCaT keratinocytes in co-culture with bacteria*

**Finger S.**, Wiegand C., Winter D., Liebert T., Heinze T., Hipler U.-C.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM), Erlangen, 26. bis 28. September 2013

- *In vitro Untersuchung der antimykotischen Wirkung von funktionalisierten Biomakromolekülen gegenüber Candida albicans, Malassezia pachydermatis und Trichophyton rubrum*

**Finger S.**, Wiegand C., Liebert T., Heinze T., Hipler U.-C.

47. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. (DMykG), Tübingen, 05. bis 07. September 2013

- *Funktionalisierte Biomakromoleküle schützen humane HaCaT-Keratinocyten im Co-Kulturmodell vor bakteriellen Infektionen*

**Finger S.**, Winter D., Wiegand C., Liebert T., Heinze T., Hipler U.-C.

47. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG), Dresden, 01. bis 04. Mai 2013

- *Functional biomacromolecules and their properties on human HaCaT keratinocytes in co-culture with bacteria*

**Finger S.**, Winter D., Wiegand C., Liebert T., Heinze T., Hipler U.-C.

40th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Dessau, 14. bis 16. März 2013

- *Functional characterization of textiles outfitted with cyclodextrin-antiseptics-complexes*

Wiegand C., Zieger M., **Finger S.**, Buschmann H.-J., Hipler U.-C.

18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), Berlin, 11. bis 15. Juni 2012

- *Comparison of nephelometric and luminometric methods for testing antifungal activity of cyclodextrin-antiseptics-complexes*

**Finger S.**, Wiegand C., Wöstemeyer J., Buschmann H.-J., Hipler U.-C.

39th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Marburg, 01. bis 03. März 2012

- *Funktionelle Evaluierung von textilen Trägern mit Cyclodextrin-Antiseptika-Komplexen*  
Wiegand C., Zieger M., **Finger S.**, Buschmann H.-J., Hipler U.-C.  
45. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. (DMyKG), Kiel, 01. bis 03. September 2011
- *Comparison of nephelometric and luminometric methods for testing antifungal activity of cyclodextrin-antiseptics-complexes*  
**Finger S.**, Wiegand C., Wöstemeyer J., Buschmann H.-J., Hipler U.-C.  
39th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Marburg, 1. bis 3. März 2012
- *Hemocompatibility of polyamide foil equipped with dendritic polymer and zinc additive*  
Baum N., Zieger M., Wiegand C., Gladitz M., Bauer J., **Finger S.**, Reinemann S., Hipler U.-C.  
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM), Gießen, 10. bis 12. November 2011
- *Vergleich nephelo- und luminometrischer Messmethoden in Hinblick auf antimykotische Wirkungen von Cyclodextrin-Antiseptika-Komplexen*  
**Finger S.**, Wiegand C., Wöstemeyer J., Buschmann H.-J., Hipler U.-C.  
45. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V. (DMyKG), Kiel, 01. bis 03. September 2011
- *Funktionelle Evaluierung von textilen Trägern mit Cyclodextrin-Antiseptika-Komplexen*  
Wiegand C., Zieger M., **Finger S.**, Buschmann H.-J., Hipler U.-C.  
46. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG), Dresden, 30. März bis 02. April 2011
- *Functional characteristics of textiles equipped with cyclodextrin-antiseptics-complexes*  
Wiegand C., Zieger M., **Finger S.**, Buschmann H.-J., Hipler U.-C.  
38th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Tübingen, 17. bis 19. Februar 2011

### Sonstiges

- Teilnahme an der 2. ADF Winter School „Sensors and effects in skin damage and repair“, Umweltforschungsstation Schneefernerhaus, Zugspitze, 31. Januar bis 02. Februar 2013